



**Álvaro Tomaz de
Lemos**

**Efeito combinado de pressão e temperatura no
Armazenamento Hiperbárico do sumo de melancia**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2016

**Álvaro Tomaz de
Lemos**

Efeito combinado de pressão e temperatura no Armazenamento Hiperbárico do sumo de melancia

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica do Doutor Jorge Manuel Alexandra Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão pelas oportunidades e apoio constante ao longo de toda a minha vida.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

vogais

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva
Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Ao Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva pela orientação, colaboração, cooperação, ajuda e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório e em especial à Liliana Fidalgo pela paciência, compreensão e ajuda ao longo deste percurso.

Aos meus pais por tudo o que me permitiram alcançar até agora, pelo suporte, orientação e educação que me proporcionaram.

Ao meu irmão por todo o apoio e companheirismo ao longo dos anos.

À minha família pelo suporte e carinho ao longo da vida.

A todas as pessoas que me apoiaram e acompanharam nesta etapa da minha vida.

E por fim, ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro pelas condições disponibilizadas para a realização desta tese.

palavras-chave

Armazenamento Hiperbárico, Alta Pressão, Conservação de Alimentos, Refrigeração, Sumo de Melancia

resumo

O armazenamento de muitos alimentos é altamente dependente da refrigeração o que exige um enorme gasto de energia. De entre as alternativas, uma recente, o armazenamento hiperbárico (sob pressão) tem-se mostrado eficaz na conservação de diversos alimentos. Assim, o objetivo desta tese foi avaliar o efeito do armazenamento hiperbárico (AH) de sumo de melancia a 50, 62,5 e 75 MPa a diferentes temperaturas (10 °C, 15 °C e temperatura ambiente (TA \approx 25 °C)) para uma conservação a longo prazo (estudado até 62 dias) de sumo de melancia sem qualquer processamento prévio, comparativamente com armazenamento à pressão atmosférica (PA) sobre refrigeração a 4 °C (RF) e a 15 °C (PA/15 °C). Na generalidade, as amostras sob PA/15 °C e RF apresentaram um aumento em todas as contagens microbianas para valores acima dos 6,0 log UFC/mL depois de 3 e 7 dias de armazenamento, respetivamente. Comparativamente com RF, o AH a 50 MPa mostrou um menor aumento em todas as contagens microbianas até ao 7º dia, enquanto que 62,5 e 75 MPa, as contagens iniciais foram reduzidas após 58 e 21 dias, respetivamente, para mesófilos (MES) e psicrófilos aeróbios totais (PSI) para cerca de 2,5 log UFC/mL e para baixo do limite de deteção para *Enterobacteriaceae* e bolores e leveduras.

Os resultados mostraram claramente que os níveis de temperatura e de pressão devem ser combinados para inibir/inativar o desenvolvimento microbiano. Deste modo, o AH a 50 MPa/10 °C, permitiu aumentar o tempo de prateleira do sumo de melancia em 21 dias enquanto que a 50 MPa/15 e TA (\approx 25 °C) o sumo atingiu os 6,0 log UFC/mL ao fim de 7 e 3 dias, respetivamente para MES e PSI tal como acontecera sob RF. Por outro lado, com o AH a 75 MPa, o tempo de prateleira do sumo de melancia obtido foi pelo menos de 62 dias quer para 15 °C, quer para TA. Neste sentido, o AH foi eficiente, não só no controlo da estabilidade microbiana, mas também apresentou menores alterações nos parâmetros físico-químicos comparativamente com a RF. Em suma, a 50 MPa a diminuição da temperatura teve maior impacto no desenvolvimento microbiológico do que a 75 MPa, pois o AH a 75 MPa foi independente da temperatura. Em conclusão, o AH aumentou o tempo de prateleira do sumo para pelo menos 62 dias, indicando um grande potencial para substituição futura do RF, com menores custos e menor pegada de carbono.

keywords

Hiperbaric Storage, High Pressure, Food Preservation, Refrigeration, Watermelon Juice

abstract

Storage of many foods is highly dependent of refrigeration which means a great energy costs. One of the most recent alternatives, hyperbaric storage (under pressure) shows to be efficient for preservation of several foods. Thus, the goal of this thesis was to evaluate the effect of hyperbaric storage (HS) of watermelon juice at 50, 62.5 and 75 MPa at different temperatures (10 °C, 15 °C and room temperature (RT \approx 25 °C)) for long term preservation until 62 days, comparatively to storage at atmospheric pressure (AP) under refrigeration at 4 °C (RF) and at 15 °C (AP/15 °C). Actually, samples stored at AP/15 °C and RF presented an increase in all microbial loads to values above 6.0 log CFU/mL after 3 and 7 days of storage, respectively. Compared to RF, HS at 50 MPa showed a slower increase in all microbial counts up to 7th day, while at 62.5 and 75 MPa, the watermelon juice initial loads were reduced after 58 and 21 days, respectively, for total aerobic mesophiles and total aerobic psychrophiles by about 2.5 log CFU/mL and to below the detection limit for *Enterobacteriaceae* and yeasts and moulds.

The results clearly showed that temperature and pressure should be combined to inhibit/inactivate the microbial development. Thus, at 50 MPa/10 °C allowed increase the shelf-life of watermelon juice to 21 days while 50 MPa/15 °C and 50 MPa/RT, the juice reached the 6.0 log CFU/mL at the end of 7 and 3 days respectively to MES and PSI, as happened with RF. On other hand, with HS at 75 MPa, the shelf life of watermelon juice was at least 62 days for temperatures of 15 °C and RT. In these cases, the HS was efficient, not only in control of microbial stability, but also presented minor changes on physicochemical parameters comparatively with RF. In conclusion at 50 MPa, the decrease in temperature promoted a higher impact on microbial growth than 75 MPa, where was verified that HS at 75 MPa was temperature independent. Summarily, HS increased watermelon juice shelf-life for at least 62 days, indicating a great potential for future replacement of RF, with additionally lower energy costs and a lower carbon footprint.

Índice Geral

Lista de Abreviaturas	III
Índice de Figuras	V
Índice de Tabelas	VII
1. Introdução.....	1
1.1. Sumo de Melancia.....	1
1.1.1. Características Físico-Químicas	1
1.1.2. Deterioração Microbiológica	4
1.1.3. Benefícios para a Saúde	5
1.2. Processamento e Conservação de Sumo de Melancia	7
1.3. Alta Pressão na Indústria Alimentar	8
1.3.1. Princípios da Tecnologia de Alta Pressão	9
1.3.2. Efeito da Alta Pressão na Estrutura e Conformação das Biomoléculas	10
1.3.3. Efeito da Alta Pressão na Inativação de Microrganismos	11
1.3.4. Efeito da Alta Pressão em Sumo de Melancia.....	12
1.4. Armazenamento Hiperbárico	13
1.4.1. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura Subzero	17
1.4.2. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura de Refrigeração	18
1.4.3. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura Ambiente	19
1.4.3.1. Caso de Estudo – Sumo de Melancia.....	21
2. Objetivos	25
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Preparação do Sumo de Melancia.....	27
3.2. Armazenamento Hiperbárico.....	27
3.3. Análises Microbiológicas.....	28
3.3.1. Mesófilos e Psicrófilos Aeróbios Totais	28
3.3.2. <i>Enterobacteriaceae</i>	28
3.3.3. Bolores e Leveduras	28
3.3.4. Bactérias Mesófilas Formadoras de Esporos	29
3.3.5. Contagens dos Microrganismos	29
3.4. Análises Físico-Químicas	30
3.4.1. pH.....	30

3.4.2.	Sólidos Solúveis Totais	30
3.4.3.	Turbidez	30
3.4.4.	Cor	30
3.4.5.	Análise Estatística.....	31
4.	Resultados e Discussão.....	33
4.1.	Análise Microbiológica.....	33
4.1.1.	Armazenamento Hiperbárico a 15 °C	33
4.1.2.	Armazenamento Pós-Hiperbárico a 15 °C	37
4.1.3.	Armazenamento Hiperbárico a 50 MPa.....	39
4.1.4.	Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa.....	42
4.1.5.	Armazenamento Hiperbárico a 100 MPa/TA	45
4.1.6.	Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa/TA	47
4.2.	Análise Físico-Química	49
4.2.1.	Armazenamento Hiperbárico a 15 °C	49
4.2.2.	Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa.....	55
5.	Conclusão	61
6.	Perspetivas Futuras.....	63
7.	Referências.....	65
8.	Anexos	71

Lista de Abreviaturas

AH	- Armazenamento hiperbárico
AH/RF	- Armazenamento hiperbárico à temperatura de refrigeração
AH/SZ	- Armazenamento hiperbárico à temperatura subzero
AH/TA	- Armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente
AP	- Alta pressão
APH	- Armazenamento pós-hiperbárico
ASL	- Argininosuccinato liase
ASS	- Argininosuccinato sintetase
a_w	- Atividade da água
BAL	- Bactérias ácido lácticas
BL	- Bolores e Leveduras
BMFE	- Bactérias mesofílicas formadoras de esporos
ENT	- <i>Enterobacteriaceae</i>
EUA	- Estados Unidos da América
FAO	- <i>Food and Agriculture Organisation</i> (Organização de Alimentação e Agricultura)
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i> (Administração para a Alimentação e Drogas)
HACCP	- Análise de perigos e controlo de pontos críticos
HPL	- Hidroperóxido liase
Log	- Logaritmo decimal
LOX	- Lipoxigenase
MES	- Microrganismos mesófilos aeróbios totais
NO	- Óxido nítrico
NOS	- Óxido nítrico sintase
NP	- Norma portuguesa
Pa	- Pascal
PA	- Pressão atmosférica
PG	- Poligalacturonase
PME	- Pectina-metil esterase
POD	- Peroxidase
PPO	- Polifenol-oxidase
PSI	- Microrganismos psicrófilos aeróbios totais
UFC	- Unidades formadoras de colónias
USDA	- <i>United States Department of Agriculture</i> (Departamento de Agricultura dos EUA)

Índice de Figuras

- Figura 1** – Representação esquemática da produção de arginina nas células do córtex renal a partir de citrulina (a) e representação esquemática da interconversão de citrulina em óxido nítrico via arginina em células do nosso organismo que produzem NO (ASS - argininosuccinato sintetase; ASL - argininosuccinato liase; óxido nítrico sintase; NO - óxido nítrico) (b) (adaptado por tradução de Husson, et al. (2003)). 6
- Figura 2** – Crescimento do número de equipamentos de Alta Pressão na indústria e distribuição dos equipamentos por continentes (gentilmente cedido por hiperbaric.com). .. 8
- Figura 3** – Fotografia do submarino Alvin 8 meses após ter ficado submerso (a). Alimentos recuperados do Alvin depois da exposição a 1540 m de profundidade durante 10 meses (b) (adaptado de Jannasch, Eimhjellen, Wirsén, and Farmanfarmaian (1971)). 14
- Figura 4** – Diagrama de fases da água (A - Temperatura de refrigeração; B - Pressurização; C - Redução da temperatura para subzero) (adaptado de Kalichevsky, et al. (1995)). 18
- Figura 5** – Valores inicial e de 8, 16, 24, 48 e 60 horas para microrganismos mesófilos totais em sumo de melancia a diferentes condições (pressão atmosférica/TA, pressão atmosférica/refrigerado, pressão atmosférica/30 °C, AH/TA (100 MPa a ≈ 20 °C) e AH/TA (100 MPa a 30 °C)) (adaptado de Fidalgo, et al. (2014)). 22
- Figura 6** – Valores iniciais e para 8 horas de microrganismos mesófilos aeróbios em sumo de melancia refrigerado (castanho), 20 °C (cinzento), 25 °C (amarelo), 30 °C (azul) e a 37 °C (verde) (adaptado de Santos, et al. (2014)). 23
- Figura 7** – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 50 MPa/15 °C e 75 MPa/15 °C e 58 dias sob AH a 62,5 MPa/15 °C; e sob pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – G) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d). Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas $\geq 6.5 \log \text{UFC/mL}$ ou abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 34
- Figura 8** – Armazenamento Pós-Hiperbárico de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração (≈ 4 °C) à pressão atmosférica (0,1 MPa). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de APH para cada microrganismo (a – b). Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 38
- Figura 9** – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 50 MPa, a 10, 15 °C e TA (≈ 25 °C). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – c).

Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas $\geq 6.5 \log \text{UFC/mL}$ ou abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 40

Figura 10 – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 75 MPa, a 15 °C e TA ($\approx 25 \text{ °C}$). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b). Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas $\geq 6.5 \log \text{UFC/mL}$ ou abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 43

Figura 11 – Evolução da carga microbiana de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 55 dias de armazenamento sob: AH a 100 MPa/TA ($\approx 25 \text{ °C}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada microrganismo (a – c). Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 45

Figura 12 – Efeito do AH a 75 MPa/TA ($\approx 25 \text{ °C}$) sob as Bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE) durante 55 dias de armazenamento. Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$ 48

Figura 13 – pH, sólidos solúveis totais (SST) e turbidez para sumo de melancia armazenado durante 21 dias sob: AH a 50, 62,5 e 75 MPa a 15 °C; e a pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d). 52

Figura 14 – Parâmetros colorimétricos instrumentais (CIELab) e diferença de total de cor (ΔE^*) para sumo de melancia armazenado durante 21 dias sob: AH a 50, 62,5 e 75 MPa a 15 °C; e a pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d). 54

Figura 15 – pH, sólidos solúveis totais (SST) e turbidez para sumo de melancia armazenado sob: AH a 75 MPa/15 °C (21 dias) e sob AH a 75 MPa/TA ($\approx 25 \text{ °C}$) (62 dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – C) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b). 56

Figura 16 – Parâmetros colorimétricos instrumentais (CIELab) e diferença de total de cor (ΔE^*) para sumo de melancia armazenado sob: AH a 75 MPa/15 °C (21 dias) e sob AH a 75 MPa/TA ($\approx 25 \text{ °C}$) (62 dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – D) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b). 59

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Composição nutricional da melancia (adaptado por tradução de USDA (2015)).	3
Tabela 2 – Estudos sobre AH à temperatura subzero, à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente encontrados na literatura.	16
Tabela 3 – Carga microbiana e propriedades físico-químicas iniciais observadas no sumo cru sob AH a 15 °C.....	33

1. Introdução

1.1. Sumo de Melancia

Atualmente existe um aumento da procura pelos consumidores de alimentos de grande qualidade, naturais e saudáveis, fazendo com que as entidades governativas invistam uma grande quantidade de recursos para promover o consumo de frutos e vegetais frescos (Tlili, Hdider, Lenucci, Ilahy, Jebari, & Dalessandro, 2011). A melancia é um fruto comum consumido por toda a bacia do mediterrâneo (Tlili, Hdider, Lenucci, Riadh, Jebari, & Dalessandro, 2011) e o seu consumo é sazonal, principalmente, entre maio e setembro (Tlili, Hdider, Lenucci, Ilahy, et al., 2011). Esta é o principal fruto da família dos *Cucurbitaceae* sendo o terceiro mais produzido nos USA (Arocho, Bellmer, Maness, McGlynn, & Rayas-Duarte, 2012). Em Portugal, a produção de melancia foi cerca de 4 mil toneladas em 2012 (FAO, 2015).

Neste momento, há um aumento na procura de sumos de frutos frescos (Aguiló-Aguayo, Montero-Calderón, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2010) e o sumo de melancia é conhecido por ter excelentes propriedades para a saúde pela sua composição em minerais (K, Mg, Ca e Fe), aminoácidos, particularmente a citrulina e arginina, vitaminas (A, B, C e E) e uma grande variedade de antioxidantes como carotenóides e compostos fenólicos (Perkins-Veazie, Collins, Davis, & Roberts, 2006; Tlili, Hdider, Lenucci, Riadh, et al., 2011). Adicionalmente, o sumo de melancia é cada vez mais consumido devido ao seu sabor refrescante, odor característico e cor atrativa (Aguiló-Aguayo, Montero-Calderón, et al., 2010; Huor, Ahmed, Rao, & Cornell, 1980). No entanto, é um alimento altamente perecível e facilmente deteriorado devido ao rápido crescimento microbiano e à elevada atividade enzimática (Oberoi & Sogi, 2015), pois apresenta um elevado valor de atividade de água (a_w) e baixa acidez. Perante isto, é necessário recorrer à refrigeração para o conservar, mas o prazo de validade nestas condições é curto.

1.1.1. Características Físico-Químicas

A melancia é um alimento com diversas variedades e com forma, cor da casca e da polpa diferentes (Soumya & Ramana Rao, 2014). A acidez, a textura da polpa e a cor constituem parâmetros físico-químicos importantes para avaliar o estado de amadurecimento da melancia (Soteriou, Kyriacou, Siomos, & Gerasopoulos, 2014). Mediante isto, a

caraterização físico-química de frutos e a quantificação dos seus compostos com atividade biológica é fundamental para avaliar o valor nutricional e funcional, bem como também o valor potencial final do produto (Soumya, et al., 2014).

Durante o amadurecimento ocorrem diversas alterações bioquímicas que modificam a estrutura e a fisiologia de frutos da família *Cucurbitaceae*, tendo origem na atividade de enzimas tais como a polifenol-oxidase (PPO), a pectina metil esterase (PME), a poligalacturonase (PG) e a peroxidase (POD) (Chisari, Barbagallo, Spagna, & Artés, 2009). A ação hidrolítica da PG e PME nos frutos e vegetais aumenta a degradação das pectinas. Outro processo que origina a perda de qualidade dos frutos é a oxidação de pigmentos fenólicos tais como as antocianinas devido ao acastanhamento enzimático promovido principalmente pela PPO. Na presença de oxigénio, esta enzima catalisa a hidroxilação de monofenóis em difenóis e destes em quinonas. Por outro lado, a POD é uma enzima oxirredutase envolvida no acastanhamento enzimático, porque catalisa reações de oxidação usando peróxidos ou oxigénio como aceitador de eletrões, promovendo alterações na cor e no sabor dos sumos (Pérez, Sanz, Olías, & Olías, 1999). Assim sendo, a colheita da melancia na etapa certa de maturação é a chave para obter um fruto com ótima qualidade (Soumya, et al., 2014).

Relativamente à cor, este é um parâmetro importante no que diz respeito à aceitabilidade dos frutos por parte dos consumidores (Arocho, et al., 2012) e na melancia a cor deve-se essencialmente aos carotenóides, principalmente o licopeno (Feng, Ghafoor, Seo, Yang, & Park, 2013). A alteração deste parâmetro durante o armazenamento deve-se a processos químicos e bioquímicos incluindo reações enzimáticas, acastanhamento não enzimático, caramelização e oxidação do ácido ascórbico (Arocho, et al., 2012). Além disso, o sumo de melancia tem $\text{pH} \approx 5,9$ e $a_w \approx 0,97 - 0,99$ (Santos, Queirós, Fidalgo, Inácio, Lopes, Mota, et al., 2014) o que favorece o desenvolvimento microbiano (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martín-Belloso, 2008) provocando para além da degradação microbiológica, a alteração da cor do sumo.

Em geral, o aroma dos frutos resulta de uma mistura complexa de um grande número de compostos voláteis em que a sua composição específica depende da espécie e mesmo da variedade dos frutos mas, em alguns casos, o aroma característico é originado maioritariamente por um único composto (Pérez, et al., 1999). No caso da melancia, o aroma resulta de uma mistura de compostos, destacando-se principalmente, aldeídos, álcoois,

cetonas e furanos, como o 6-metil-5-hepten-2-ona e o hexanal (Aguiló-Aguayo, Montero-Calderón, et al., 2010; Beaulieu & Lea, 2006). Os ácidos gordos são os principais contribuintes para o aroma de plantas e frutos, sendo que muitos compostos voláteis encontrados nos frutos e vegetais são formados nas reações envolvidas na degradação de ácido linoleico e linolénico pela lipoxigenase (LOX) e hidroperóxido liase (HPL). A HPL cliva ácidos gordos e hidroperóxidos em aldeídos e oxoácidos, mas está presente nas plantas em pequenas quantidades. Esta enzima apresenta três tipos dada a sua especificidade: 9-HPL, 13-HPL e HPL não específica (Pérez, et al., 1999), tendo em conta a posição da ligação dupla em que exerce a sua função catalítica. Da mesma forma, a ação destas enzimas pode originar odores desagradáveis pela formação de grandes quantidades destes compostos (Aguiló-Aguayo, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2010b).

Em termos químicos, a melancia é um produto rico em água, açúcares, antioxidantes e minerais. Os principais minerais são o potássio, magnésio, fósforo e cálcio que são essenciais na regulação de processos fisiológicos (Soumya, et al., 2014). A sua ingestão representa uma dieta baixa em calorias, gorduras saturadas e colesterol (Feng, et al., 2013; INSA, 2015), como se observa na **Tabela 1**. A melancia proporciona ainda uma dieta rica em antioxidantes como carotenóides (licopeno e β -caroteno), fenóis e polifenóis, antocianinas e flavonóis (Soumya, et al., 2014), vitaminas (A, C e E) e citrulina (Tlili, Hdidier, Lenucci, Ilahy, et al., 2011), um aminoácido com valor funcional como será explicado na secção 1.1.3.

Tabela 1 – Composição nutricional da melancia (adaptado por tradução de USDA (2015)).

Nutrientes/100 g		Vitaminas/100 g	
Água (g)	91,45	Vitamina C (mg)	8,1
Energia (kcal)	30	Tiamina (mg)	0,033
Proteínas (g)	0,61	Riboflavina (mg)	0,021
Lípidos totais (g)	0,15	Niacina (mg)	0,178
Hidratos de Carbono (g)	7,55	Vitamina B-6 (mg)	0,045
Fibras (g)	0,40	Vitamina B-12 (μ g)	0,00
Açúcares totais (g)	6,20	Acido fólico (μ g)	3
		Vitamina A (μ g)	28
		Vitamina E (mg)	0,05
		Vitamina D (μ g)	0,0
		Vitamina K (μ g)	0,1
Minerais/100 g		Lípidos/100 g	
Cálcio (mg)	7	Ácidos gordos saturados (g)	0,016
Ferro (mg)	0,24	Ácidos gordos monoinsaturados (g)	0,037
Magnésio (mg)	10	Ácidos gordos polinsaturados (g)	0,050
Fósforo (mg)	11	Colesterol (mg)	0
Potássio (mg)	112		
Sódio (mg)	1		
Zinco (mg)	0,10		

1.1.2. Deterioração Microbiológica

A melancia é considerada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como um alimento potencialmente perigoso (FDA, 2009) que potencia o crescimento de microrganismos patogénicos e degradativos (Mosqueda-Melgar, et al., 2008). Os microrganismos representam dois pontos críticos para a indústria alimentar: o primeiro diz respeito à presença e crescimento de microrganismos patogénicos que resultam em surtos alimentares; e o segundo é devido à deterioração e redução do prazo de validade de alimentos (Penteado & Leitão, 2004a). Os microrganismos presentes, normalmente, em frutos e vegetais são mesófilos aeróbios totais (MES), psicrófilos (PSI), bolores e leveduras (BL), bactérias ácido-láticas (BAL) e *Enterobacteriaceae* (ENT). Além destes, a presença de alguns patogénicos, como *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter*, é responsável por intoxicações alimentares e hospitalizações (M. Abadias, Usall, Anguera, Solsona, & Viñas, 2008), uma vez que, a lavagem industrial não garante a eliminação total destes microrganismos, quando presentes.

Em frutos e vegetais, a microflora em MES é muito semelhante à microflora em PSI, portanto, muitos microrganismos são capazes de crescer a temperaturas baixas de conservação, embora os MES diminuam a sua taxa de crescimento (M. Abadias, et al., 2008). Em relação às ENT, os seus níveis em frutos e vegetais crus são frequentemente elevados e por isso, estes não são usados como indicador da qualidade microbiológica destes produtos, já que estes microrganismos fazem parte da sua flora natural (M. Abadias, et al., 2008). Os BL podem originar a produção do odor fermentado e alterar a cor do produto devido, por exemplo, à produção de CO₂ (Tournas, Heeres, & Burgess, 2006). Este tipo de microrganismos encontra-se em sumos frescos com valores de aproximadamente 3 log UFC/mL (Fidalgo, Santos, Queirós, Inácio, Mota, Lopes, et al., 2014).

Em relação a microrganismos patogénicos, os surtos de *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 têm sido associados ao consumo de melancia bem como à ingestão do seu sumo (Mosqueda-Melgar, Raybaudi-Massilia, & Martín-Belloso, 2007). A maioria destes surtos está relacionada com a presença de patogénicos na casca do fruto, possivelmente contaminado por irrigação com água contaminada ou mesmo devido ao mau manuseamento por parte dos operários (FDA, 2009). Estes patogénicos são posteriormente transferidos para o sumo durante a sua preparação (Mosqueda-Melgar, et al., 2007). É por isso necessário o controlo rigoroso da temperatura destes produtos desde o seu processamento ao seu

consumo, incluindo o transporte, distribuição, armazenamento e manuseamento por parte dos consumidores (Maribel Abadias, Alegre, Oliveira, Altisent, & Viñas, 2012). O crescimento e sobrevivência de *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7 e *L. monocytogenes* em sumos de melancia têm sido descritos em diversos estudos (Mosqueda-Melgar, et al., 2007; Penteado, et al., 2004a; Penteado & Leitão, 2004b; Sharma, Adler, Harrison, & Beuchat, 2005; Walsh, Bennett, Mahovic, & Gould, 2014) e mesmo em baixos níveis (1 – 100 UFC/mL) podem provocar problemas de saúde (Mosqueda-Melgar, et al., 2007). Industrialmente, a aplicação de tratamentos térmicos permite a redução da deterioração provocada por microrganismos e enzimas, no entanto o calor pode afetar a qualidade sensorial e nutricional de sumos (Aguiló-Aguayo, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2010a; Aguiló-Aguayo, Soliva-Fortuny, et al., 2010b).

1.1.3. Benefícios para a Saúde

Diversos estudos defendem que a melancia é constituída por biomoléculas que promovem a saúde dos consumidores, principalmente o licopeno e a citrulina (Feng, et al., 2013; Mosqueda-Melgar, et al., 2008; Soumya, et al., 2014). A classe dos antioxidantes, no qual se insere o licopeno, constituem um grupo de compostos capazes de inibir a oxidação de lípidos e de outras moléculas, prevenindo ou reparando o dano causado pelos radicais livres nas células (Soumya, et al., 2014; Tlili, Hdider, Lenucci, Riadh, et al., 2011). A melancia e o seu sumo são descritos como uma importante fonte de licopeno altamente biodisponível para os humanos (Tlili, Hdider, Lenucci, Riadh, et al., 2011) e, por isso, a sua ingestão em simultâneo com outros antioxidantes como o ácido ascórbico e desidro-ascórbico presente nestes alimentos, está associada a uma atenuação da aterosclerose, redução da incidência de doenças coronárias e de alguns tipos de cancro (Feng, et al., 2013; Oms-Oliu, Odriozola-Serrano, Soliva-Fortuny, & Martín-Belloso, 2009; Poduri, Rateri, Saha, Saha, & Daugherty, 2013; Tlili, Hdider, Lenucci, Ilahy, et al., 2011).

A melancia é também conhecida como uma importante fonte de L-citrulina que tinha, até algum tempo, pouco interesse nutricional. Esta é um aminoácido não essencial, quase inexistente nos alimentos naturais, apesar da melancia ser uma das raras exceções (Tarazona-Díaz, Alacid, Carrasco, Martínez, & Aguayo, 2013). A citrulina foi identificada pela primeira vez na melancia (Rimando & Perkins-Veazie, 2005) e pode ser convertida em arginina durante o ciclo da ureia, principalmente nos rins, através das enzimas

argininosuccinato sintetase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL) (**Figura 1a**) (**Husson, Brasse-Lagnel, Fairand, Renouf, & Lavoinne, 2003**). A arginina é um precursor na síntese de biomoléculas com grande interesse biológico nomeadamente o óxido nítrico (NO), pela óxido nítrico sintase (NOS), que desempenha um papel essencial em funções imunológicas e cardiovasculares (**Collins, Wu, Perkins-Veazie, Spears, Claypool, Baker, et al., 2007; Husson, et al., 2003**). Atualmente, a citrulina é considerada o maior protetor do radical hidroxilo, permitindo à planta resistir ao *stress* provocado por ambientes agressivos como a privação de água. No nosso organismo, a citrulina tem a capacidade de gerar NO via arginina, não sendo necessário a sua prévia conversão em arginina antes de chegar à célula alvo (**Figura 1b**) (**Husson, et al., 2003**).

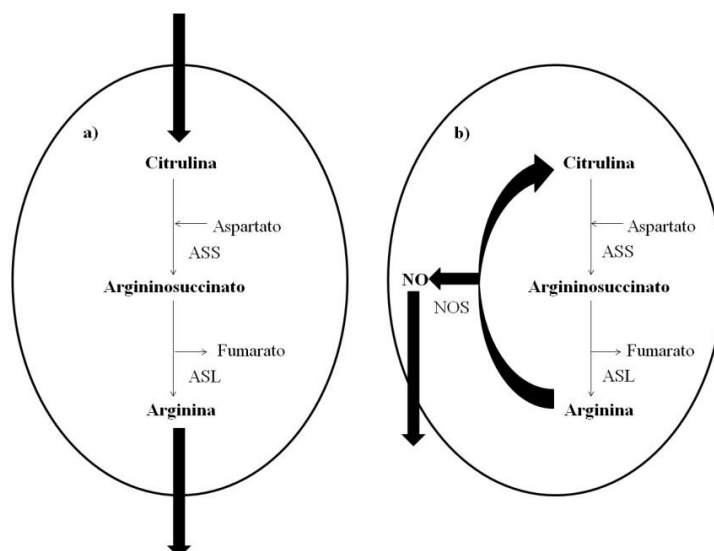


Figura 1 – Representação esquemática da produção de arginina nas células do córtex renal a partir de citrulina (a) e representação esquemática da interconversão de citrulina em óxido nítrico via arginina em células do nosso organismo que produz NO (ASS - argininosuccinato sintetase; ASL - argininosuccinato liase; óxido nítrico sintase; NO - óxido nítrico) (b) (adaptado por tradução de **Husson, et al. (2003)**).

Esta peculiaridade faz da citrulina um candidato para o tratamento de situações patológicas caracterizadas pelo *stress* oxidativo e pela diminuição da disponibilidade de arginina, tais como a hipertensão, a aterosclerose e a anemia falciforme (**Figuerola, Sanchez-Gonzalez, Perkins-Veazie, & Arjmandi, 2011; Tarazona-Díaz, et al., 2013**). O sumo de melancia é também um excelente alimento para atletas que pretendam aumentar o seu rendimento desportivo (**Tarazona-Díaz, et al., 2013**), já que o consumo do mesmo aumenta as concentrações sanguíneas de citrulina que é eficaz na redução da dor muscular (**Collins, et al., 2007**), apresentando elevada biodisponibilidade quando é ingerida neste alimento.

1.2. Processamento e Conservação de Sumo de Melancia

Relativamente ao processamento do sumo de melancia, o tratamento térmico é o método industrial mais utilizado para a sua pasteurização (Liu, Hu, Zhao, & Song, 2012), uma vez que, a pasteurização permite a inativação microbiológica e enzimática contribuindo para a segurança alimentar e para o aumento do prazo de validade (Aguiló-Aguayo, Montero-Calderón, et al., 2010). No entanto, a melancia é um fruto termo-sensível e o calor afeta a qualidade sensorial e nutricional dos sumos (Aguiló-Aguayo, Soliva-Fortuny, et al., 2010a, 2010b; Caminiti, Palgan, Muñoz, Noci, Whyte, Morgan, et al., 2012; Feng, et al., 2013; Mosqueda-Melgar, et al., 2008) além de que, este necessita de ser refrigerado depois de ter sido aberto para reduzir a proliferação microbiana. A pasteurização térmica origina alterações na cor e viscosidade do sumo de melancia incluindo a perda de licopeno (Zhang, Trierweiler, Li, Butz, Xu, Rüfer, et al., 2011). Por outro lado, os compostos que contribuem para o odor do sumo são muito sensíveis durante o processamento e instáveis durante o armazenamento (Aguiló-Aguayo, Montero-Calderón, et al., 2010) enquanto que, a biodisponibilidade da L-citrulina no sumo pasteurizado é menor do que no sumo fresco (Tarazona-Díaz, et al., 2013). Porém, o processamento térmico continua a ser um dos métodos mais utilizados na preservação de sumos (Caminiti, et al., 2012) pois este é eficaz na inativação de microrganismos patogénicos e deteriorativos (Mosqueda-Melgar, et al., 2008).

O aumento da procura por produtos naturais, frescos e nutricionalmente saudáveis têm conduzido a indústria alimentar para a procura de tecnologias alternativas, não térmicas, que mantenham os atributos naturais dos alimentos (Caminiti, et al., 2012). Por esta razão, novas tecnologias e metodologias foram desenvolvidas e estudadas de modo a poderem ser uma alternativa à pasteurização térmica, das quais se destaca a alta pressão (AP). Esta tem sido usada para inativar microrganismos deteriorativos e patogénicos e enzimas em sumos de frutos mantendo a sua viscosidade, cor e qualidade nutricional (Guiavarc'h, Segovia, Hendrickx, & Van Loey, 2005; Laboissière, Deliza, Barros-Marcellini, Rosenthal, Camargo, & Junqueira, 2007; Mota, Lopes, Delgadillo, & Saraiva, 2013; Oey, Lille, Van Loey, & Hendrickx, 2008; Zhang, et al., 2011). A AP é um tipo de processamento não térmico que permite a manutenção das propriedades sensoriais de sumos termo-sensíveis, como é o caso do sumo de melancia (Liu, Zhao, Zou, & Hu, 2013; Queiros, Rainho, Santos, Fidalgo, Delgadillo, & Saraiva, 2014) como será explicado na secção

1.3.4. Desta forma, as tecnologias não térmicas podem ter vantagens relativamente ao tratamento térmico de sumos (Caminiti, et al., 2012), dado que podem minimizar as alterações organoléticas no sumo, sendo uma boa opção para a substituição do processamento térmico neste tipo de produtos.

1.3. Alta Pressão na Indústria Alimentar

Inicialmente esta tecnologia foi implementada na indústria cerâmica, mas desde há muitos anos, alguns investigadores verificaram a possibilidade da sua aplicação na área alimentar. Em 1899 nos EUA, Bert H. Hite desenvolveu os primeiros trabalhos para pasteurização do leite por AP e confirmou que a aplicação de pressão aumentava o prazo de validade de leite (Balasubramaniam, Martínez-Monteagudo, & Gupta, 2015). Em 1990 foi lançado o primeiro produto comercial processado por AP no Japão, e em 1997 guacamole tratado por AP foi comercializado nos EUA. Na realidade, apenas nos finais do séc. XX, a tecnologia em questão começou a afirmar-se como uma alternativa a outras tecnologias de processamento de alimentos e como resultado disso, existiu um aumento do número de sistemas industriais de AP (Balasubramaniam, et al., 2015; Knorr, Froehling, Jaeger, Reineke, Schlueter, & Schoessler, 2011), principalmente a partir de 2010, como se pode ver pela **Figura 2**.

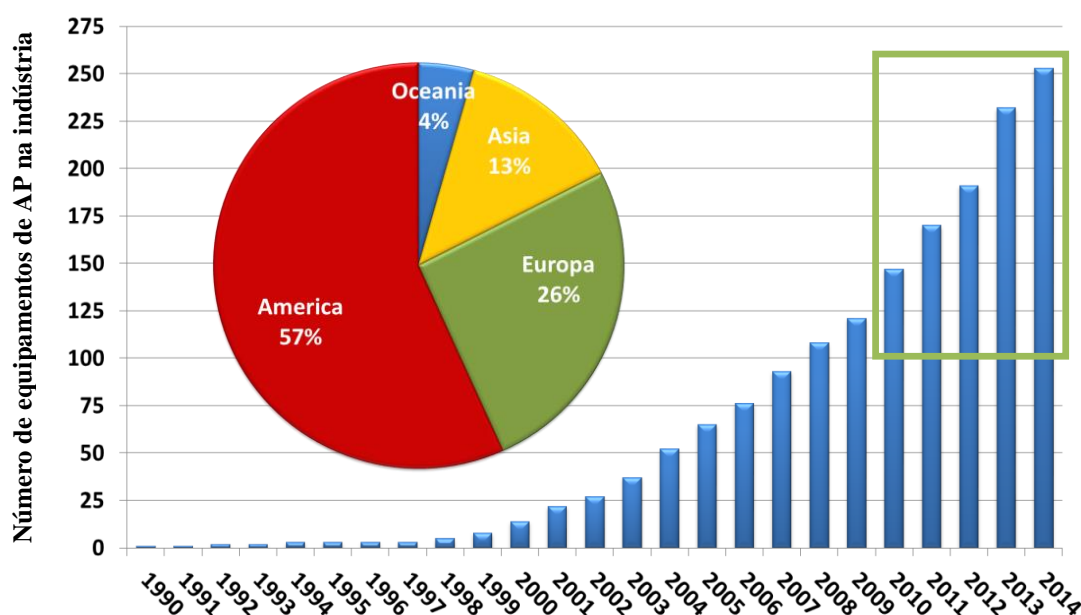


Figura 2 – Crescimento do número de equipamentos de Alta Pressão na indústria e distribuição dos equipamentos por continentes (gentilmente cedido por hyperbaric.com).

AP (hidrostática) é um processamento que envolve o uso de pressão entre 100 a 800 MPa, com ou sem aplicação de calor, com o objetivo de inativar microrganismos, ou seja, eliminar microrganismos patogénicos, bactérias deteriorativas, bolores, leveduras, vírus e esporos para assegurar a segurança microbiológica dos alimentos (**Balasubramaniam, et al., 2015**). A constante procura de produtos prontos-a-consumir com sabor próximo do natural e com o mínimo uso de aditivos tem vindo a mostrar que a tecnologia de AP é a mais eficaz para o tratamento suave dos alimentos (**Knorr, et al., 2011**). Hoje em dia, a AP é usada industrialmente para a pasteurização a frio de um amplo número de alimentos, tais como refeições pré-cozinhadas, bebidas, frutos e vegetais. Para tal, é aplicada pressão entre 400 e 600 MPa, de segundos a alguns minutos, assegurando a destruição de microrganismos vegetativos (**Duarte, Moreira, Fernandes, Fidalgo, Santos, Queiros, et al., 2015**). Adicionalmente, aplicação de AP pode originar novos produtos com texturas e estruturas diferentes, podendo ser usado para a produção de novos produtos (**Rastogi, Raghavarao, Balasubramaniam, Niranjana, & Knorr, 2007**).

1.3.1. Princípios da Tecnologia de Alta Pressão

A AP baseia-se em dois princípios: o princípio da pressão isostática e o princípio de Le Chatelier. O primeiro consiste no facto da pressão ser aplicada uniformemente em todas as direções independentemente do tempo e espaço. Assim, a pressão é transmitida instantaneamente e homogeneamente pelo alimento independentemente da sua geometria e tamanho (**Balasubramaniam, et al., 2015**). O segundo princípio indica que quando um sistema é perturbado tende a minimizar essa perturbação, isto é, com o aumento da pressão ocorre uma diminuição de volume (**Balasubramaniam, et al., 2015; Knorr, et al., 2011**). Por isso, as embalagens dos produtos sujeitos a AP devem ser suficientemente flexíveis para aguentar essa variação. Associado à compressão que ocorre na aplicação desta tecnologia, verifica-se ainda um aumento da temperatura devido ao aquecimento adiabático gerado que, dependendo da composição do alimento, pode ser diferente. No geral, alimentos com grande quantidade de água apresentam um aumento de 3 °C por cada 100 MPa. Contudo, alimentos com maior teor de gordura apresentam um maior aumento de temperatura (**Balasubramaniam, et al., 2015**).

No processamento, o produto é inserido na câmara de alta pressão de forma automática ou manual, dependendo do equipamento de AP, e o vaso é fechado. A pressão é posteriormente gerada por um sistema de bombagem de fluído de transmissão, geralmente água que está em contacto com a embalagem ou produto, ocorrendo a pressurização. Depois de atingida a pressão pretendida, a bomba é desligada, as válvulas fecham e num sistema ideal não é requerida energia adicional para manter o nível de pressão constante no vaso de compressão, por um período de tempo indeterminado (**Knorr, et al., 2011; Rastogi, et al., 2007**). Depois de decorrido o tempo necessário para um determinado ciclo de pressurização, o sistema é despressurizado e o produto é retirado. O ciclo de pressurização corresponde à soma dos tempos de pressurização, de manutenção da pressão e de despressurização.

Uma vantagem da AP em relação ao tratamento térmico é que no segundo, é necessário um gasto contínuo de energia para manter a temperatura constante e aquecer todo o alimento, incluindo o seu interior (**Knorr, et al., 2011**), o que origina maiores custos e pode alterar as propriedades nutricionais e organoléticas do produto. Do mesmo modo, o uso da AP permite o tratamento da amostra na sua embalagem final, o que diminui o risco de contaminações microbiológicas no pós-processamento do produto. Concluindo, com o crescente investimento nesta tecnologia, os consumidores tem vindo a usufruir de alimentos com maior prazo de validade e com as características desejadas.

1.3.2. Efeito da Alta Pressão na Estrutura e Conformação das Biomoléculas

Das principais biomoléculas das nossas células, as macromoléculas como as proteínas são as mais afetadas pela AP (**Hendrickx, Ludikhuyze, Van den Broeck, & Weemaes, 1998**). A estrutura primária das proteínas raramente é afetada, porque as ligações covalentes mantêm-se inalteradas, uma vez que estas apresentam reduzida compressibilidade e, por isso, são pouco influenciadas pela pressão (**Mújica-Paz, Valdez-Fragoso, Samson, Welti-Chanes, & Torres, 2011**). No entanto, a estrutura secundária sofre alterações a pressões elevadas pois, é mantida por ligações de hidrogénio que ao serem quebradas originam a desnaturação da proteína. A estrutura terciária mantida à custa de ligações não covalentes é largamente condicionada já que, com o aumento da pressão (acima 200 MPa) existe alteração das ligações iónicas, o que altera a conformação da proteína, perdendo a sua função. A estrutura quaternária é a mais sensível aos efeitos desta tecnologia, porque a baixas pressões (abaixo de 150 MPa) a conformação tridimensional das proteínas

multiméricas, mantidas por interações hidrofóbicas, é desfeita (**Huang, Lung, Yang, & Wang, 2014; Knorr, et al., 2011**). Assim, as enzimas são facilmente inativadas a pressões baixas por perda da estrutura quaternária. Exemplo disto é o uso da AP na inativação de algumas enzimas, tais como as lipases, a PME, e a POD, que são muito importantes na degradação de alimentos (**Hendrickx, et al., 1998; Liu, et al., 2013; Rastogi, et al., 2007**). No mesmo sentido, as macromoléculas como amido podem alterar a sua estrutura (**Knorr, et al., 2011**). Por outro lado, as moléculas com baixo peso molecular como vitaminas, péptidos e alguns polissacarídeos, sofrem efeitos mínimos na sua estrutura devido à sua alta incompressibilidade (**Cheftel & Culioli, 1997**). Portanto, a AP apresenta um avanço relativamente ao tratamento térmico, dado que o calor altera as ligações covalentes das proteínas alterando a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (**Hendrickx, et al., 1998**).

1.3.3. Efeito da Alta Pressão na Inativação de Microrganismos

AP pode ser aplicada com o objetivo de inativar microrganismos nos alimentos. Nos alimentos existem microrganismos com diversas características fisiológicas que apresentam diferentes níveis de resistência à AP (**Huang, et al., 2014**). Assume-se que o efeito primário sobre os microrganismos da AP é a inativação das enzimas do seu metabolismo, inibindo a sua proliferação e levando à sua morte (**Knorr, et al., 2011**) pois, com aplicação de AP, a estrutura quaternária e terciária de proteínas que é responsável pela atividade enzimática, é desnaturada (**Huang, et al., 2014**). Por outro lado, ocorre a rutura da integridade da membrana que altera a morfologia e características físicas da célula, porque elevadas pressões provocam a permeabilização das membranas (**Rastogi, et al., 2007; Ritz, Freulet, Orange, & Federighi, 2000**). Estes processos originam a desregulação da entrada e saída de metabolitos da célula, como a absorção de nutrientes e a acumulação de compostos tóxicos no interior da célula levando à alteração das vias metabólicas (**Huang, et al., 2014**). Os efeitos negativos provocados pela AP nas enzimas de replicação e transcrição de ADN são também uma das causas da inativação microbiana que provoca a condensação do material genético, degradando cromossomas através da excisão de ADN e enzimas (**Huang, et al., 2014**).

Os vírus parecem ser muito sensíveis à AP, uma vez que esta desnatura as proteínas da *capside*, que são essenciais na ligação do vírus ao hospedeiro (**Heinz & Buckow, 2010**).

Contudo, os esporos de bactérias são muito difíceis de eliminar, sendo necessário um nível de pressão acima dos 1000 MPa combinados com temperaturas próximas dos 100 °C para os conseguir eliminar. Pensa-se que a estrutura e espessura de revestimento de esporos bacterianos pode explicar essa elevada resistência (**Huang, et al., 2014; Reddy, Solomon, Tetzloff, & Rhodehamel, 2003**). Contudo, os microrganismos procariontes são mais resistentes do que os eucarióticas (**Huang, et al., 2014**). Em relação aos eucariontes, as bactérias gram-negativas são mais sensíveis do que bactérias gram-positivas (**Cheftel, et al., 1997; Huang, et al., 2014**).

1.3.4. Efeito da Alta Pressão em Sumo de Melancia

Extensas investigações nesta área têm revelado potenciais benefícios da aplicação da AP para aumentar a qualidade de sumos, inativando microrganismos e enzimas que causam a degradação das características organoléticas do sumo, aumentando o prazo de validade de sumos naturais (**Liu, et al., 2013; Rastogi, et al., 2007**). Relativamente ao sumo de melancia, a aplicação de AP (600 – 900 MPa/0 – 60 min) permitiu verificar que a 600 MPa existiu a manutenção da cor e da viscosidade dinâmica. O mesmo tratamento não apresentou alterações no conteúdo de licopeno do sumo (**Zhang, et al., 2011**). Em 2006, **Qiu, Jiang, Wang, and Gao (2006)** verificaram que o conteúdo de licopeno é máximo a 400 MPa, apresentando perdas entre 500 e 600 MPa quando processados a 20 °C por 12 minutos. Num estudo posterior, **Liu, et al. (2012)** realizaram um ensaio em que aplicaram pressões de 200, 400 e 600 MPa entre 0 e 60 minutos e averiguaram que as atividades enzimáticas da PPO, POD e PME do sumo de melancia diminuem significativamente com o aumento da pressão de 200 para 600 MPa. No caso da PME, existiu um decréscimo linear com o aumento do tempo de processamento obtendo-se uma atividade mínima de 23,2% face ao valor inicial, no processamento de 600 MPa/60 min. No entanto, a acidez titulável, pH, conteúdo em sólidos solúveis totais, conteúdo em licopeno e o conteúdo em fenóis totais não sofreram alterações significativas quando comparado com o controlo que não foi tratado por AP. No mesmo estudo, concluiu-se ainda que o grau de acastanhamento do sumo diminuiu com o aumento da pressão e esta teve um pequeno efeito na cor do sumo de melancia o que está de acordo com o que foi verificado por **Zhang, et al. (2011)**, onde os processamentos de AP (600 MPa/60 min) e AP (900 MPa/60 min) foram os que mais reduziram o grau de acastanhamento. Sabe-se que, o acastanhamento do sumo inclui reações de *Maillard* bem

como o acastanhamento enzimático provocado pela ação da PPO e da POD. A inibição destas reações pela AP permite a diminuição do grau de acastanhamento e manutenção da cor dos sumos (Liu, et al., 2013). Estes resultados demonstram que a pasteurização a frio é eficaz na inativação de microrganismos e enzimas sem alterar nem os parâmetros físico-químicos nem os compostos bioativos presentes em sumos.

1.4. Armazenamento Hiperbárico

Para uma conservação adequada de muitos alimentos durante o processamento, transporte, armazenamento e comercialização, é necessário recorrer a temperaturas de refrigeração. A conservação de alimentos é altamente dependente da refrigeração o que acarreta elevados gastos energéticos e aumenta a produção de CO₂, contribuindo para o aquecimento global e para as alterações climáticas que ameaçam o nosso planeta. Na realidade, cerca de 35 – 50% do total da energia usada nos supermercados é consumida em processos relacionados com a refrigeração (Bermejo-Prada, Vega, Pérez-Mateos, & Otero, 2014). Estima-se que 40% dos alimentos requerem refrigeração e consomem cerca de 15% da eletricidade em todo mundo. Além disso, a cadeia de refrigeração é responsável pela produção mundial de 1% de CO₂ (James & James, 2010). Estes processos contribuem para um aumento na temperatura global o que irá aumentar a deterioração de alimentos e o risco de intoxicações com origem alimentar (James, et al., 2010). Desta forma, a necessidade do desenvolvimento de uma nova metodologia que assegure a conservação de produtos com menor dispêndio de energia e mais amiga do ambiente, permite que surjam novas oportunidades para a conservação alimentos (Bermejo-Prada, et al., 2014).

Atualmente, o armazenamento hiperbárico (AH) é uma das alternativas mais promissoras que têm suscitado maior interesse na comunidade científica devido à sua capacidade de minimização de gastos energéticos quando comparado com a refrigeração (Fernandes, Moreira, Duarte, Santos, Queirós, Fidalgo, et al., 2015). Este novo método de conservação de alimentos, sob pressão, utiliza pressões mais baixas do que o processamento por AP, usualmente entre 25 – 220 MPa, durante todo o tempo de armazenamento (de semanas a alguns meses). O AH apresenta como principal objetivo a inibição do crescimento microbiológico, tal como acontece com a refrigeração, permitindo ter resultados iguais, ou em alguns casos melhores do que a refrigeração em produtos como sumos (Bermejo-Prada, et al., 2014; Fernandes, Moreira, Fidalgo, Santos, Queiros,

Delgadillo, et al., 2015; Fidalgo, et al., 2014; Queirós, Santos, Fidalgo, Mota, Lopes, Inácio, et al., 2014), sopas (Moreira, Fernandes, Duarte, Santos, Fidalgo, Santos, et al., 2015), requeijão (Duarte, et al., 2015) e fiambre (Fernandes, Moreira, Duarte, et al., 2015). Esta nova metodologia surgiu acidentalmente quando o submarino Alvin se afundou a 6 de outubro de 1968 (**Figura 3a**). Depois de 10 meses a uma profundidade de 1540 m (\approx 15 MPa) sujeito a condições de temperaturas entre 3 – 4 °C, o submarino foi recuperado juntamente com alguns alimentos que estavam no seu interior em embalagens de plástico como maçãs, caldo de carne e sanduíches (**Figura 3b**). Pela aparência geral, sabor, aroma, consistência e ensaios microbiológicos preliminares, estes alimentos estavam conservados. Contudo, quando os mesmos produtos foram mantidos sob refrigeração e à pressão atmosférica, degradaram-se em poucas dias/semanas.

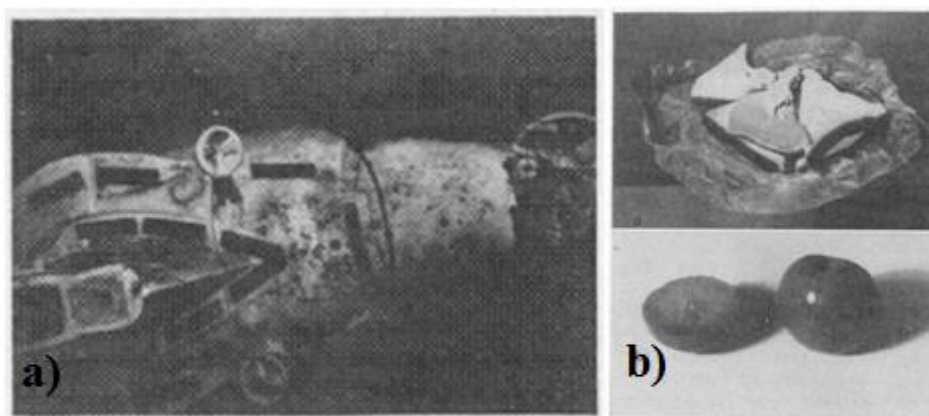


Figura 3 – Fotografia do submarino Alvin 8 meses após ter ficado submerso (a). Alimentos recuperados do Alvin depois da exposição a 1540 m de profundidade durante 10 meses (b) (adaptado de **Jannasch, Eimhjellen, Wirsén, and Farmanfarmaian (1971)**).

Posteriormente, **Jannasch, et al. (1971)** simulando as condições a que o submarino esteve sujeito, confirmaram que a combinação da alta pressão e baixa temperatura inibiu o crescimento de microrganismos, permitindo manter a qualidade destes alimentos durante 10 meses. Esta observação indicou que a taxa de crescimento microbiano é 10 a 100 vezes menor nas condições em que o Alvin esteve submerso do que quando comparado com o crescimento à superfície (**Jannasch, et al., 1971**). A compilação dos trabalhos científicos sobre AH à temperatura subzero (AH/SZ), ou seja, armazenamento sob pressão a temperaturas inferiores a 0 °C sem congelar o alimento, à temperatura de refrigeração (AH/RF), ou seja, armazenamento sob pressão a temperaturas \approx 4 °C e à temperatura

ambiente (AH/TA), ou seja, armazenamento sob pressão a temperaturas $\approx 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou superiores, encontrados na literatura são apresentados na **Tabela 2**.

Nos últimos anos, o AH tem sido estudado por vários investigadores (**Bermejo-Prada, Segovia-Bravo, Guignon, & Otero, 2015; Fidalgo, et al., 2014; Queiros, et al., 2014; Santos, et al., 2014; Segovia-Bravo, Guignon, Bermejo-Prada, Sanz, & Otero, 2012**) e os resultados indicam que este permite o aumento do prazo de validade dos alimentos tendo um efeito mínimo sob as características organoléticas e nutricionais dos alimentos, e minimizando os gastos energéticos (**Fernandes, Moreira, Fidalgo, et al., 2015**). Um estudo piloto foi realizado durante uma tese doutoral em que avaliaram o impacto ambiental do AH/TA comparativamente com a refrigeração (**Bermejo-Prada, 2014**). Para isso, foram simplificadas algumas variáveis incluindo o volume do equipamento, os materiais para a sua construção, a quantidade de amostra por cada armazenamento e o consumo elétrico obtendo um valor estimado em termos custos e de pegada de carbono. Este estudo permitiu concluir que a pegada de carbono do AH/TA a 25 MPa é cerca de 26 vezes menor do que a pegada de carbono da refrigeração, provando que esta metodologia é amiga do ambiente. Por outro lado, os custos (€/kg de sumo) associados ao AH a 25 MPa/TA por 15 dias é cerca de 3 vezes superior ao custo da refrigeração a 4 °C nos mesmos 15 dias. No entanto, é importante salientar que os custos associados ao AH/TA são principalmente consequência do investimento inicial quer na produção quer na aquisição de equipamentos com volumes adequados ao armazenamento de alimentos, já que o custo energético é praticamente negligenciável, enquanto que os custos associados à refrigeração são relativos essencialmente ao consumo elétrico, o que a longo prazo pode encorajar o investimento no AH. Assim, é expectável que esta nova metodologia seja comercializada nos próximos anos como uma alternativa/melhoria à refrigeração atualmente usadas (**Bermejo-Prada, López-Caballero, & Otero, 2016; Fernandes, Moreira, Fidalgo, et al., 2015; Pinto, Moreira, Fidalgo, Santos, Delgadillo, & Saraiva, 2016**).

Tabela 2 – Estudos sobre AH à temperatura subzero, à temperatura de refrigeração e à temperatura ambiente encontrados na literatura.

Produto	Condições Experimentais	Resultados	Referência
Armazenamento Hiperbárico à temperatura subzero			
Filetes de bacalhau	22,8 MPa, -3 °C, 36 dias	Estável e consumível por 36 dias. Qualidade melhor ou semelhante às amostras congeladas.	Charm, Longmaid Iii, and Carver (1977)
Tomates e morangos	50-200 MPa, -5 a -20 °C, algumas semanas	Sabor fresco com manutenção da cor e sabor.	Deuchi T and R (1992)
Carne de porco	50-200 MPa, -5 a -20 °C, algumas semanas	Menor perda de água da carne.	Deuchi T, et al. (1992)
Armazenamento hiperbárico à temperatura de refrigeração			
Maçãs, sanduíches e caldo de carne	15 MPa, 3 a 4 °C, 10 meses	Aparência fresca dos produtos e consumíveis ao fim de 10 meses.	Jannasch, et al. (1971)
Filetes de bacalhau	24,1 MPa, 1 °C, 21 dias	Sem alterações microbiológicas e com elevada qualidade a nível sensorial.	Charm, et al. (1977)
Peixe Pargo	24,1 MPa, 1 °C, 12 dias		
Armazenamento hiperbárico à temperatura ambiente			
Filetes de tilapia	100 e 200 MPa, 25 °C, 12 horas	Inibição microbiológica a 100 MPa e redução em cerca de 2 log UFC/g em MES e PSI a 200 MPa.	Ko and Hsu (2001)
Sumo de morango	25, 100 e 220 MPa, 20 °C, 15 dias	Redução de MES (> 2 log UFC/mL) e BL (>1 log UFC/mL).	Segovia-Bravo, et al. (2012)
	50 e 200 MPa, 20 °C, 15 dias	Preservação da cor e inibição microbiológica. Inativação da POD.	Bermejo-Prada and Otero (2015)
		Perfil volátil do sumo semelhante ao sumo fresco/cru.	Bermejo-Prada, et al. (2014)
		Pressão até 200 MPa não afeta a PME, mas provoca um decréscimo na viscosidade.	Bermejo-Prada, Segovia-Bravo, et al. (2015)
	25, 50, 100 e 200 MPa, 20 °C, 1, 15 dias	A 25 MPa desacelera o crescimento microbiano. Pressão de 50 MPa reduz a carga microbiana inicial. Pressões de 100 e 200 MPa originam uma redução microbiana por 15 dias.	Bermejo-Prada, et al. (2016)
Sumo de melancia	100 MPa, 18-21 e 30 °C, 60 horas	Redução de MES (> 1 log UFC/mL), ENT (>2 log UFC/mL) e BL (>2 log UFC/mL), pH, sólidos solúveis totais, acidez titulável, grau acastanhamento e turbidez melhor do que à temperatura ambiente.	Fidalgo, et al. (2014)
	25 a 150 MPa, 30 °C, 8 horas	Nenhum efeito inibitório a 25 MPa. Inibição microbiológica a 50 e 75 MPa, e inativação microbiana a 100 e 150 MPa (entre 1 e 2 log UFC/mL). Estabilidade de pH, grau de acastanhamento e turbidez.	Santos, et al. (2014)

	100 MPa, 18-21 °C, 7 dias	Redução microbiana a 100 MPa para MES e PSI (> 2 log UFC/mL) e ENT e BL para níveis abaixo do limite de deteção. Manutenção de pH, sólidos solúveis totais, turbidez, grau de acastanhamento e cor com valores semelhantes aos valores iniciais.	Pinto, et al. (2016)
Sumo de melão	25 a 150 MPa, 25, 30 e 37 °C, 8 horas	Nenhum efeito inibitório a 25 MPa. Inibição microbiológica a 50 e 75 MPa, e inativação microbiana a 100 e 150 MPa (entre 1 e 2 log UFC/mL). Estabilidade de pH, grau de acastanhamento e turbidez.	Queirós, et al. (2014)
Fiambre	25 a 150 MPa, 25, 30 e 37 °C, 8 horas	Nenhum efeito inibitório a 25 MPa. Inibição microbiológica a 50 MPa, e inativação microbiana a 100 e 150 MPa (entre 1 e 3 log UFC/mL). Estabilidade no pH, cor e capacidade de retenção de água.	Fernandes, Moreira, Duarte, et al. (2015)
Requeijão	100 e 150 MPa, 25, 30 e 37 °C, 8 horas	Inibição microbiológica a 100 MPa e inativação microbiana a 150 MPa (entre 1-2 log UFC/g). Nenhuma alteração na a_w , pH e oxidação lipídica.	Duarte, et al. (2015)
Sopa de cenoura	100 e 150 MPa, 25, 30 e 37 °C, 8 horas	Inibição microbiológica a 100 MPa e inativação microbiana a 150 MPa (1 log UFC/g em ENT, BL e BAL para níveis abaixo do limite de deteção e entre 2 – 4 log UFC/mL para MES). Manutenção da cor, pH e açúcares redutores.	Moreira, et al. (2015)

Legenda: a_w - atividade de água; BAL - bactérias ácido lácticas; BL - bolores e leveduras; ENT - *Enterobacteriaceae*; MES - mesófilos aeróbios totais; UFC - unidades formadoras de colónias.

1.4.1. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura Subzero

O AH/SZ permite armazenar alimentos a temperaturas inferiores a 0 °C sem que haja modificações estruturais resultantes do processo de congelação e descongelação dos alimentos (**Kalichevsky, Knorr, & Lillford, 1995**). Isto porque, AP diminui o ponto de congelação da água para valores abaixo de 0 °C (≈ -22 °C). Primeiro, é necessário que o alimento esteja a temperaturas baixas (≈ 4 °C) sendo de seguida pressurizado até ≈ 209 MPa e por fim, reduz-se a temperatura para valores negativos, evitando assim o congelamento do alimento (**Figura 4**). Este método de conservação é particularmente importante para alimentos sólidos, onde o processo de congelação e descongelação pode causar danos em células e tecidos originando modificações na textura dos alimentos (**Fidalgo, et al., 2014**).

Charm, et al. (1977) realizaram o primeiro estudo laboratorial de AH em filetes de bacalhau. O AH a -3 °C e 22,8 MPa por 36 dias de filetes de bacalhau foi avaliado por um painel sensorial experiente que verificou que estes tinham igual ou melhor qualidade comparativamente com as amostras a 0,1 MPa. Num estudo posterior, a aplicação de AH (50 – 200 MPa de -5 a -20 °C por algumas semanas) permitiu reduzir a perda de água da

carne de porco e manteve o sabor, textura e cor de tomates e morangos (Deuchi T, et al., 1992). Contudo, esta metodologia ainda requer custos durante o período de armazenamento mas menores do que na congelação, onde é necessário energia para a mudança de fase da água líquida para sólida (Fidalgo, et al., 2014).

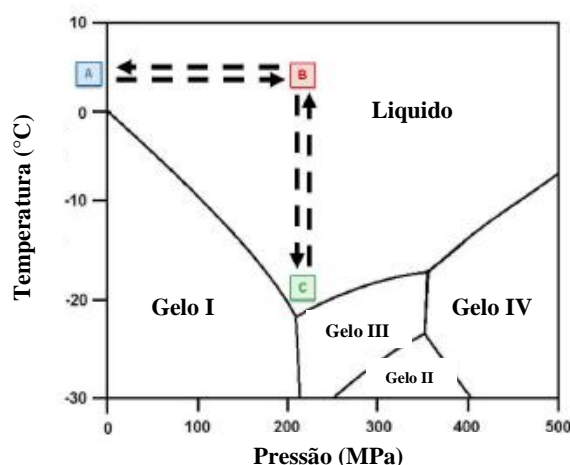


Figura 4 – Diagrama de fases da água (A - Temperatura de refrigeração; B - Pressurização; C - Redução da temperatura para subzero) (adaptado de Kalichevsky, et al. (1995)).

1.4.2. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura de Refrigeração

O AH/RF visa inibir o crescimento de microrganismos prolongando o tempo de prateleira dos alimentos comparativamente com a refrigeração. Depois de Jannasch, et al. (1971) terem verificado que maçãs e sanduíches se mantinham preservadas com AH/RF (15 MPa por 3 a 4 °C e 10 meses), Charm, et al. (1977) demonstraram que AH/RF (24 MPa a 1 °C por 21 e 12 dias) em filetes de bacalhau e peixe pargo inibia o crescimento microbiológico e reduzia a atividade enzimática da POD entre 25 a 30%, aumentando o prazo de validade destes produtos considerados altamente perecíveis enquanto que, à mesma temperatura mas à pressão atmosférica (0,1 MPa), estes eram rapidamente deteriorados. Com estes resultados, é possível concluir que a baixa temperatura em conjugação com AP, utilizadas no AH/RF, apresentam um efeito inibitório adicional na atividade das células microbianas, resultando num aumento do tempo de vida dos alimentos quando comparado com a refrigeração à pressão atmosférica (Duarte, et al., 2015; Jannasch, et al., 1971). Ainda assim, AH/RF necessita de energia para manter a temperatura de refrigeração durante o período de armazenamento dos alimentos (Fidalgo, et al., 2014; Moreira, et al., 2015).

1.4.3. Armazenamento Hiperbárico à Temperatura Ambiente

O AH/TA é a conservação de alimentos sob pressão à temperatura ambiente por períodos de tempo que podem ir de alguns dias até alguns meses (**Bermejo-Prada & Otero, 2015**). Recentemente, esta nova metodologia têm demonstrado enorme potencial na preservação de alimentos com a redução da utilização de energia em comparação com a refrigeração, pois só envolve gastos energéticos durante a fase de compressão e descompressão, não sendo necessário nenhum tipo de energia adicional para manter a pressão durante o armazenamento por longos períodos (**Queirós, et al., 2014; Segovia-Bravo, et al., 2012**). Esta metodologia provou ser capaz de inibir o crescimento de microrganismos tal como acontece com a refrigeração, no entanto, dependendo dos níveis de pressão aplicada pode mesmo reduzir a carga microbiológica (**Bermejo-Prada, Segovia-Bravo, et al., 2015; Fidalgo, et al., 2014; Queirós, et al., 2014**).

O primeiro estudo em filetes de tilápia armazenados sob AH/TA (100 MPa a 25 °C por 12 horas) permitiu manter os valores iniciais de MES e PSI, enquanto que a 200 MPa a redução foi de 2,0 log UFC/g (**Ko, et al., 2001**). Nos últimos anos, vários autores mostraram que AH/TA pode ser interessante para preservar diferentes tipos de sumos como sumo de morango (**Bermejo-Prada & Otero, 2015; Segovia-Bravo, et al., 2012**), sumo de melancia (**Fidalgo, et al., 2014; Santos, et al., 2014**) e sumo de melão (**Queirós, et al., 2014**). Em sumo de morango **Segovia-Bravo, et al. (2012)** concluíram que AH/TA (25, 100 e 220 MPa a 20 °C por 15 dias) foi capaz de reduzir a carga microbiana inicial em cerca de 2 log UFC/mL de MES, e BL para níveis abaixo do limite de deteção independentemente da pressão usada, enquanto que, sob refrigeração existiu um aumento de ambas as contagens de microrganismos em mais de 2 log UFC/mL. Porém, o sumo de morango possui um pH \approx 3,3 e por isso tem maior estabilidade microbiológica devido ao seu pH ácido. Adicionalmente, o AH/TA (200 MPa a 20 °C por 15 dias) foi eficaz na atenuação da perda da cor em parte pela inativação da POD. No entanto, o mesmo tratamento originou uma redução na viscosidade do sumo que pode ser explicada pelo facto da PME não ser inativada, o que promove a hidrólise do grupo metoxilo das pectinas do sumo originando metanol e ácido galactúrico e consequentemente, a sedimentação do sumo (**Bermejo-Prada & Otero, 2015; Bermejo-Prada, Segovia-Bravo, et al., 2015**). Os mesmos autores (**Bermejo-Prada, et al., 2014**) demonstraram ainda que o perfil volátil do sumo de morango armazenado sob pressão

durante 15 dias era mais semelhante ao sumo inicial, do que o armazenado sob refrigeração. Estes resultados podem ser explicados tendo em conta que, como o AH/TA inibe o desenvolvimento microbiano, impede também que estes produzam o aroma a fermentado tipicamente associado a alimentos deteriorados por microrganismos. Noutro estudo, **Queirós, et al. (2014)** verificaram que em sumo de melão o AH a 50 e 75 MPa apresenta resultados semelhantes à refrigeração para MES, ENT e BL enquanto que a 100 e 150 MPa, as contagens foram inferiores para todas as temperaturas testadas (25, 30 e 37 °C). A 25 MPa, nenhum efeito inibitório foi observado. Em relação aos parâmetros físico-químicos pH, acidez titulável, grau acastanhamento e turbidez, estes não apresentam uma variação significativa comparativamente com as amostras refrigeradas. Em fiambre, os níveis microbiológicos a 25, 30 e 37 °C e com o AH (25 MPa por 4 e 8 horas) atingiram níveis microbiológicos iguais para MES e BAL ($\approx 5 \log \text{UFC/g}$) à pressão atmosférica. Contudo, a 50 MPa ocorreu a inibição de MES, BAL, ENT e BL para valores semelhantes à refrigeração, no entanto, para 100 e 150 MPa, constatou-se a inativação microbiológica com valores de aproximadamente 1 log UFC/g mais baixos do que sob refrigeração. No geral, os parâmetros físico-químicos de fiambre armazenado sob pressão foram também semelhantes ao armazenado sob refrigeração.

Noutro estudo, **Duarte, et al. (2015)** estudaram o efeito do AH/TA (100 e 150 MPa, 25-37 °C por 4 e 8 horas) em requeijão. Estes autores evidenciaram que independentemente da temperatura, a 100 MPa o requeijão manteve os níveis microbiológicos semelhantes à refrigeração e que o aumento da pressão para 150 MPa reduz a carga microbiológica em 1 log UFC/g para MES e para níveis inferiores ao limite de deteção em ENT, BL e BAL. Resultados semelhantes foram descritos em sopa de cenoura (**Moreira, et al., 2015**) em que se observou que a 100 MPa existiu inibição microbiológica, ao passo que a 150 MPa ocorreu inativação de microrganismos. Além disso, os parâmetros físico-químicos foram mais uma vez semelhantes aos valores das amostras refrigeradas (**Moreira, et al., 2015**). Em suma, pressões inferiores a 50 MPa não provocam inibição do crescimento microbiológico mas, a 100 e 150 MPa existe inativação de microrganismos (**Fernandes, Moreira, Duarte, et al., 2015**). O efeito de inibição microbiológica deve-se à resistência e adaptação dos microrganismos a pressões entre 50 e 75 MPa, no entanto, a pressões superiores a 100 MPa, a viabilidade dos microrganismos é afetada principalmente devido ao aumento da permeabilização das membranas celulares e à desnaturação de enzimas chave no

metabolismo dos microrganismos, por exemplo, enzimas responsáveis pela tradução e transcrição de ADN (**Huang, et al., 2014**).

Embora diferentes estratégias tenham sido adotadas nos trabalhos apresentados acima relativamente ao AH/TA, as principais conclusões foram que: este novo método inibe o crescimento microbiano com menores custos energéticos que a refrigeração; em alguns casos, dependendo dos níveis de pressão pode ocorrer inativação microbiológica; e essa inativação aumenta o prazo de validade comparativamente com as amostras refrigeradas (**Fidalgo, et al., 2014**). Embora, a aplicação do AH tenha grande potencial para ser aplicado na indústria alimentar, esta requer a idealização e produção de novos equipamentos de pressão, uma vez que os equipamentos existentes apresentam como principal finalidade a pasteurização utilizando níveis elevados de pressão. Por outro lado, como é uma nova metodologia, os custos associados aos equipamentos e manutenção dos mesmos são ainda elevados. No entanto, a produção de equipamentos que operem a pressões entre 25 – 200 MPa acarretará menores custos que a produção de equipamentos usados na pasteurização de alimentos por AP que operam a pressões próximas de 500 MPa (**Fernandes, Moreira, Duarte, et al., 2015**).

Todos estes resultados evidenciam que o AH pode representar uma metodologia interessante para a conservação de alimentos a curto prazo (**Segovia-Bravo, et al., 2012**). Contudo, mais estudos são necessários para elucidar o efeito do AH em alimentos e outros mecanismos envolvidos na degradação da qualidade dos mesmos, para além da degradação microbiológica (**Fidalgo, et al., 2014**), que são apresentados na **secção 1.4.3.1**.

1.4.3.1. Caso de Estudo – Sumo de Melancia

Recentemente, estudos de 2014 e 2015 revelaram que AH/TA pode ser interessante para conservação de sumo de melancia, embora este sumo seja um alimento altamente perecível devido ao elevado $\text{pH} > 4.6$ e $a_w > 0.9$ (**Fidalgo, et al., 2014; Santos, et al., 2014**). No que diz respeito a este sumo, existem três estudos na literatura que descrevem os efeitos do AH na conservação do mesmo. **Fidalgo, et al. (2014)** compararam o AH (100 MPa a $\approx 20^\circ\text{C}$ por 60 horas) com a refrigeração à pressão atmosférica. Depois de 8 horas de AH/TA, a carga inicial do sumo de melancia foi reduzida em 1 log UFC/mL em MES (**Figura 5**) e entre 1 a 2 log UFC/mL em ENT e BL permanecendo depois inalterada até às 60 horas. Em contrapartida, as amostras refrigeradas mantiveram os níveis microbiológicos durante 60

horas, ou seja, ocorreu inibição microbiológica, mas estes valores eram superiores aos obtidos com o AH. À temperatura ambiente e 0,1 MPa, a carga microbiana atingiu níveis inaceitáveis ($> 6,0$ log UFC/mL) após 24 horas, enquanto que a 30 °C após 8 horas a carga microbiana já estava acima dos limites de quantificação apresentando sinais claros de deterioração, como odor desagradável. Note-se ainda que, neste ensaio, a temperatura ambiente não foi controlada e variou entre 18 e 21 °C o que demonstra que mesmo à temperatura ambiente variável e não controlada, o AH pode ser utilizado como método de conservação, evitando custos associados ao controlo da temperatura.

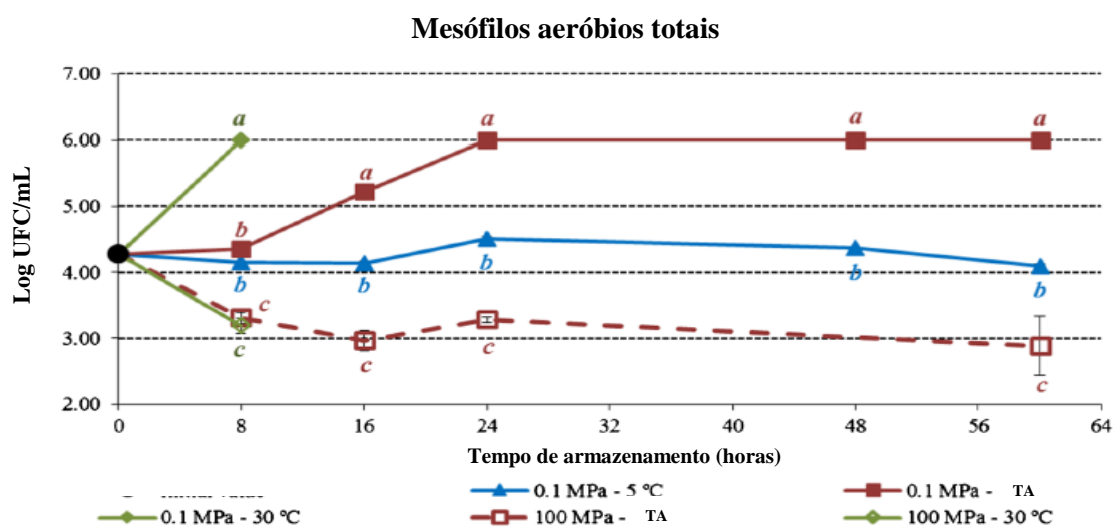


Figura 5 – Valores inicial e de 8, 16, 24, 48 e 60 horas para microrganismos mesófilos totais em sumo de melancia a diferentes condições (pressão atmosférica/TA, pressão atmosférica/refrigerado, pressão atmosférica/30 °C, AH/TA (100 MPa a ≈ 20 °C) e AH/TA (100 MPa a 30 °C)) (adaptado de Fidalgo, et al. (2014)).

Esta foi a primeira evidência que é possível conservar alimentos para uma gama alargada de temperaturas ambiente. Um ano mais tarde, o mesmo grupo de investigadores utilizou uma gama de pressões entre 25 – 150 MPa a temperaturas entre 20 e 37 °C durante 8 horas comparando os resultados com amostras refrigeradas e à pressão atmosférica (Santos, et al., 2014). A 25 MPa não existiu qualquer efeito inibitório sobre os microrganismos o que está de acordo com o que outros autores verificaram em sumo de melão e sopa de cenoura (Moreira, et al., 2015; Queirós, et al., 2014). Contudo, uma pressão entre 50 a 75 MPa é necessária para ocorrer uma inibição semelhante ao que acontece com as amostras refrigeradas e entre 100 e 150 MPa verificou-se uma inativação adicional com reduções microbiológicas entre 1 a 2 log UFC/mL. Porém, os mesmos autores

destacam o facto do comportamento dos microrganismos, face às diferentes pressões, ser igual independentemente das temperaturas usadas (entre 20 e 37 °C), mostrando-se na **Figura 6** apenas o gráfico para os MES mas, igual comportamento apresentaram tanto BL como ENT.

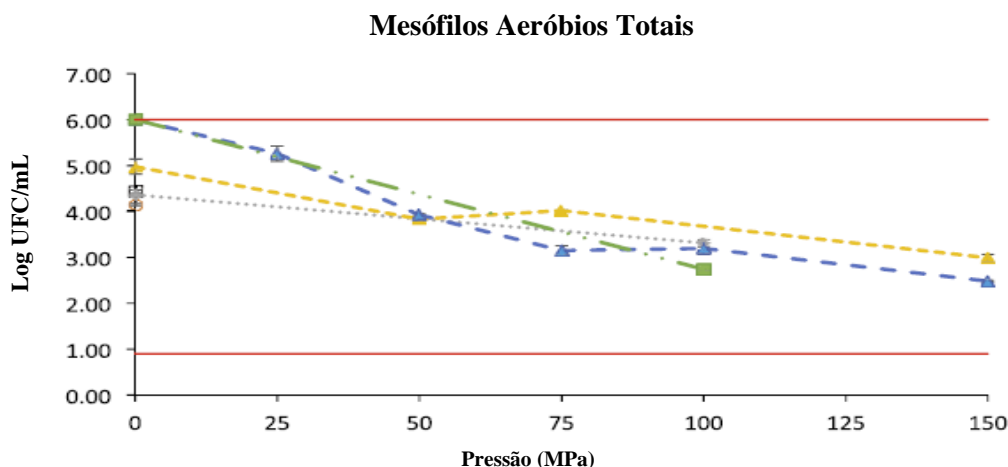


Figura 6 – Valores iniciais e para 8 horas de microrganismos mesófilos aeróbios em sumo de melancia refrigerado (castanho), 20 °C (cinzento), 25 °C (amarelo), 30 °C (azul) e a 37 °C (verde) (adaptado de Santos, et al. (2014)).

Nestes dois estudos é importante realçar que os parâmetros físico-químicos do sumo de melancia como pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais são semelhantes às amostras refrigeradas, verificando-se apenas uma diminuição dos valores da turbidez e do grau de acastanhamento do sumo armazenado sob pressão (Fidalgo, et al., 2014; Santos, et al., 2014). Recentemente, Pinto, et al. (2016) utilizou o AH (100 MPa/≈ 21 °C) por 7 dias comparando-o com a refrigeração. No fim do AH, os valores de MES, PSI e BL encontravam-se acima de 6,0 log UFC/mL para as amostras refrigeradas e à temperatura ambiente. No entanto, no sumo de melancia armazenado sob pressão, verificou-se um máximo de 2 log UFC/mL para MES e PSI e valores abaixo do limite de deteção para BL. Concluindo, estes resultados demonstraram a possibilidade do uso do AH/TA como metodologia alternativa à refrigeração, embora sejam indispensáveis mais estudos, recorrendo a tempos de armazenamento superiores com diferentes combinações de pressão e temperatura para podermos avaliar o comportamento não só dos microrganismos, mas também das enzimas quando um alimento é colocado sob estas condições. Pode-se ainda usar AH/RF para tentar aumentar o tempo de prateleira do sumo de melancia comparativamente com AH/TA, podendo-se assim compensar o maior dispêndio energético

com um maior tempo de vida do produto. Por outro lado, é importante verificar o efeito do AH em esporos e microrganismos patogénicos o que ainda não está descrito na literatura. Mediante tudo isto, novos equipamentos devem ser desenvolvidos para que os consumidores possam vir a usufruir desta nova metodologia num futuro próximo. Contudo, estes equipamentos não serão tão dispendiosos como os equipamentos usados atualmente no processamento de AP, uma vez que, os níveis de pressão utilizados no AH são inferiores.

2. Objetivos

Nesta dissertação pretendeu-se verificar o efeito da aplicação do AH nas características microbiológicas e físico-químicas do sumo de melancia. Assim, o primeiro objetivo durante a tese foi estudar a extensão do tempo de prateleira expectável do sumo de melancia armazenado sob AH (50, 62,5 e 75 MPa) a 15 °C, comparando com o armazenamento tradicional de refrigeração e também com um armazenamento à temperatura de 15 °C e pressão atmosférica. A temperatura escolhida foi 15 °C uma vez que se pretendia verificar se uma diminuição da temperatura permitia aumentar o prazo de validade deste alimento quando comparado com o mesmo alimento armazenado sob pressão a temperatura ambiente já descrito na literatura. Essa comparação inclui a análise de parâmetros microbiológicos, tais como os microrganismos mesófilos totais, bolores e leveduras, psicrofilos aeróbios totais, *Enterobacteriaceae* e bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE), e também a análise de parâmetros físico-químicos, tais como a cor, pH, conteúdo em sólidos solúveis totais e turbidez. Além disso, a influência do armazenamento pós-hiperbárico neste caso foi avaliada considerando os mesmos microrganismos acima referido. O segundo objetivo foi perceber qual a influência da combinação entre pressão (50 e 75 MPa) e temperatura (10, 15 e TA \approx 25 °C) na conservação do sumo de melancia por AH e qual o seu efeito no controlo microbiano. Concluindo, pretende-se verificar se o AH pode constituir uma alternativa à refrigeração que é até aos dias de hoje, o método mais utilizado na conservação de sumos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Preparação do Sumo de Melancia

Para a preparação do sumo de melancia, duas melancias (*Citrullus lanatus*) foram adquiridas num supermercado local e mantidas a 4 °C até serem lavadas, descascadas e trituradas de forma a produzir o sumo. Depois disso, o sumo foi filtrado, congelado e armazenado a -20 °C. Antes de cada experiência, o sumo foi descongelado a 4 °C.

3.2. Armazenamento Hiperbárico

As experiências de armazenamento hiperbárico foram realizadas a três temperaturas diferentes (10 °C, 15 °C e temperatura ambiente ($TA \approx 25$ °C)). Os ensaios a 10 e 15 °C foram realizados num equipamento de AP (Sistema de alta pressão U33, equipamento Unipress, Polónia) (**Anexo A**) utilizando as seguintes condições de armazenamento: 50 MPa a 10 °C e 50, 62,5 e 75 MPa a 15 °C. Este equipamento possui um vaso com 35 mm de diâmetro interno e 100 mm de altura, ligado a um banho termostático (Huber Compatible Control CC1, Nova Jersey, EUA) para controlar a temperatura, usando como fluido de pressurização uma mistura de propileno glicol e água (40:60, v/v) podendo operar à pressão máxima de 700 MPa e a temperaturas entre -20 e 110 °C. Os ensaios à TA foram realizados num equipamento de AP (SFP FPG13900, Stanstead Fluid Power, Stanstead, United Kingdom) (**Anexo A**) sob a pressão de 50, 75 e 100 MPa. Este sistema possui três vasos, cada um com 30 mm de diâmetro interno e 500 mm de altura, usando uma mistura de propileno glicol e água (40:60, v/v) como fluido de pressurização, sendo 200 MPa a pressão máxima a que pode operar.

As amostras foram colocadas num saco com baixa permeabilidade de polietileno/poliacrilamida (PA/PE-90, Albipack, Águeda, Portugal) em condições de assepsia, dentro de uma câmara de fluxo laminar (BioSafety Cabinet Telstar Bio II Advance, Terrassa, Espanha). Os sacos foram previamente esterilizados por radiação UV durante 10 min e posteriormente selados manualmente por calor para minimizar a quantidade de ar no interior dos sacos. Os sacos com amostra foram embalados num segundo saco selado a 85% de vácuo. Quatro amostras controlo foram mantidas à pressão atmosférica e sob refrigeração (4 °C), como também às temperaturas de 10 °C, 15 °C e TA. Estas foram também embaladas nas mesmas condições (exceto a pressão) e imersas no mesmo fluido e no escuro para

mimetizar as condições das amostras armazenadas sob AH. O armazenamento pós-hiperbárico (APH) foi realizado durante 2 e 7 dias a 4 °C e à pressão atmosférica, após 37 dias em condições de AH a 62,5 MPa/15 °C.

3.3. Análises Microbiológicas

As amostras foram analisadas para MES, PSI, ENT e BL e uma das amostras foi apenas analisada para BMFE como será explicado de seguida. Assim, imediatamente após embalar a amostra e nos dias de amostragem do ensaio de AH, 1 mL de cada amostra, foi misturado com 9 mL de solução de ringer, obtendo-se a diluição 10^{-1} . Diluições decimais foram realizadas até 10^{-4} sendo plaqueadas nos meios apropriados (**Anexo B**) em triplicado, de acordo com o tipo de microrganismos em estudo. Todos os materiais usados para a realização dos ensaios foram previamente esterilizados por UV e/ou em autoclave.

3.3.1. Mesófilos e Psicrófilos Aeróbios Totais

Na contagem de MES e PSI, 1 mL de amostra foi semeado por incorporação, em meio de cultura PCA (plate count ágar, Merck) procedendo-se à contagem após incubação a 30 ± 1 °C durante 72 ± 3 h e a 20 ± 1 °C durante 120 ± 3 h, respetivamente, como indicado na norma portuguesa (ISO 4833:2003).

3.3.2. *Enterobacteriaceae*

Para contagem de ENT, 1 mL de amostra foi semeado por incorporação em meio de cultura VRBDA (violet red bile dextrose agar, Merck). A contagem das colónias foi efetuada após incubação a 37 °C por 24 ± 1 h (ISO 8523:1991).

3.3.3. Bolores e Leveduras

Na contagem de BL, 0,2 mL de amostra foram semeados à superfície, em meio de cultura RBCA (rose-bengal chloramphenicol agar, Merck) sendo incubado a 25 ± 1 °C ao longo de 120 ± 3 h (ISO 7954:1987).

3.3.4. Bactérias Mesófilas Formadoras de Esporos

Para a quantificação das BMFE, as amostras foram tratadas de acordo com **Ziane, Desriac, Le Chevalier, Couvert, Moussa-Boudjemaa, and Leguerinel (2014)** com algumas modificações. As amostras foram previamente aquecidas a 80 °C durante 20 min, sendo de seguida imersas em gelo, sofrendo um choque térmico. Posteriormente, estas amostras foram embaladas nas mesmas condições que as outras amostras de sumo de melancia e armazenadas sob AH a 75 MPa/TA. As BMFE foram quantificadas em meio de cultura PCA (plate count agar, Merck) por incorporação de 1 mL de amostra e a contagem foi realizada 72 ± 3 h após incubação a 30 ± 1 °C.

3.3.5. Contagens dos Microrganismos

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicado de amostra e plaqueadas em duplicado para MES, PSI, ENT e BMFE, e quintuplicado para BL.

De acordo com a norma ISO 4833:2003 consideram-se contáveis as placas que apresentaram entre 15 e 300 colónias no caso de MES, PSI, ENT e BMFE e no caso de BL consideraram-se como placas contáveis as que apresentaram entre 1 e 100 colónias. A carga microbiana foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Log } N = \frac{\sum \text{colónias características}}{V \times [(n_1 + (0,1 \times n_2)) \times d]}$$

em que:

N - Unidades formadoras de colónias/mililitro (UFC/mL)

V - Volume de amostra (mL)

n_1 - Número de placas na 1ª diluição

n_2 - Número de placas na 2ª diluição

d - 1ª diluição

A carga microbiana foi determinada em logaritmo de unidades formadoras de colónias por mililitro de sumo de melancia (log UFC/mL). Os resultados foram expressos também como variação microbiológica (log (N/N₀)) calculados pela diferença entre a carga

microbiana a cada dia de armazenamento (N) e a carga microbiana inicial (N0) de cada ensaio. Valores positivos significam um crescimento microbiológico enquanto que valores negativos indicam uma redução na carga microbiana quando comparada com as contagens iniciais.

3.4. Análises Físico-Químicas

Para a determinação das características físico-químicas do sumo de melancia, procedeu-se à descongelação e homogeneização das amostras. As amostras foram analisadas para os seguintes parâmetros: pH, sólidos solúveis totais (SST), turbidez e cor. Em todos os casos, as determinações foram realizadas em duplicado de amostras e triplicado de análise.

3.4.1.pH

O pH do sumo de melancia foi determinado com um eletrodo de vidro a 20 °C (eletrodo pH 50 14, Instrumentos Crison, S.A, Espanha), calibrado com duas soluções tampão de pH 4,0 e 7,0.

3.4.2.Sólidos Solúveis Totais

O conteúdo em SST foi determinado pela medição do °Brix (Refratómetro ATAGO, ATC-1E) a 20 °C (Wang, Hu, Chen, Wu, Zhang, Liao, et al., 2006).

3.4.3.Turbidez

A turbidez da amostra foi medida através da medição direta da absorvância a 700 nm usando um espectrofotómetro UV-VIS de microplacas (Multiskan GO – Termo Fisher Scientific Inc., EUA) (Zhang, et al., 2011).

3.4.4.Cor

Para a análise da cor utilizou-se um colorímetro Konica Minolta CM 2300d (Minolta Konica, Osaka, Japão) a 20 °C de acordo com o sistema CIE_{lab}, diretamente computadorizado através do programa original SpectraMagic™ NX (Konica Minolta, Osaka, Japan), tendo-

se obtido os seguintes parâmetros: valor L^* - (0, escuro; 100, claro), valor a^* - (+, vermelho; -, verde) e valor b^* - (+, amarelo; -, azul). A diferença total de cor (ΔE^*) foi calculado de acordo com a seguinte equação (Liu, et al., 2012),

$$\Delta E^* = [(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2]^{1/2}$$

Onde o ΔE^* é a diferença total de cor entre cada amostra e o controlo, ou seja, L^* e L_0^* são a luminosidade de cada amostra e do controlo, respetivamente, a^* e a_0^* são os tons de vermelho de cada amostra e do controlo, respetivamente, e b^* e b_0^* são os tons de amarelo de cada amostra e do controlo, respetivamente, sendo que, o controlo corresponde aos valores da cor da amostra inicial.

3.4.5. Análise Estatística

Os ensaios de armazenamento foram realizados com duas amostras diferentes em cada tempo de armazenamento, sendo que, as análises microbiológicas e físico-químicas foram efetuadas em triplicado. A análise estatística dos resultados foi realizada com o programa STATISTICA 7 usando a análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey HSD com um nível de significância de 5%. Além disso, a média e o desvio padrão da média são representados em cada gráfico e respetivas tabelas.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise Microbiológica

4.1.1. Armazenamento Hiperbárico a 15 °C

Os valores iniciais para MES e PSI de sumo de melancia usados no ensaio a 15 °C variaram entre 4,34 – 4,84 e 4,25 – 4,87 log UFC/mL (**Tabela 3**), respetivamente, que foram semelhante aos valores obtidos por **Fidalgo, et al. (2014)** e **Santos, et al. (2014)** para o mesmo produto. Relativamente a ENT e BL, os valores iniciais variaram entre 3,52 – 3,70 e 3,34 – 3,81 log UFC/mL, respetivamente, sendo ligeiramente mais elevados do que os valores encontrados pelos mesmos autores.

Tabela 3 – Carga microbiana e propriedades físico-químicas iniciais observadas no sumo cru sob AH a 15 °C.

Parâmetros analisados	Intervalo de Valores
Análise microbiológica (log UFC/mL)	
Mesófilos aeróbios totais	4,34 – 4,84
Psicrófilos aeróbios totais	4,25 – 4,87
<i>Enterobacteriaceae</i>	3,52 – 3,70
Bolores e leveduras	3,34 – 3,81
Parâmetros Físico-Químicos	
pH	6,50 – 6,57
Sólidos solúveis totais (°Brix)	9,75 – 9,80
Turbidez	0,812 – 0,851
Cor	
<i>L*</i>	35,18 – 35,63
<i>a*</i>	14,74 – 15,33
<i>b*</i>	8,04 – 8,83

A **Figura 7** apresenta a variação nas contagens microbianas ($\log(N/N_0)$) de sumo de melancia armazenado nas diferentes condições de pressão a 15 °C (AH/15 °C), e à pressão atmosférica sob refrigeração a 4 °C (RF) e a 15 °C (PA/15 °C) durante 58 dias (valores podem ser consultados no **Anexo C**). Ao 3º dia, as amostras armazenadas à PA/15 °C mostraram um rápido crescimento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nas contagens microbianas de cerca de 1,6, 1,6, 2,0 e 1,8 unidades logarítmicas para MES, PSI, ENT e BL, respetivamente, comparativamente com os valores iniciais. Após 7 dias nestas condições, todas as contagens microbianas se encontravam acima do limite de aceitabilidade de 6,0 log UFC/mL, valor reportado por **Patrignani, Vannini, Kamdem, Lanciotti, and Guerzoni (2009)** como sendo o limite máximo de microrganismos para o qual o sumo de melancia pode ser consumido. Estas amostras apresentaram um odor característico a sumo fermentado e as embalagens estavam inchadas, devido ao processo de fermentação e produção de CO₂ produzido pelo aumento de BL durante o período de armazenamento (**Tournas, et al., 2006**).

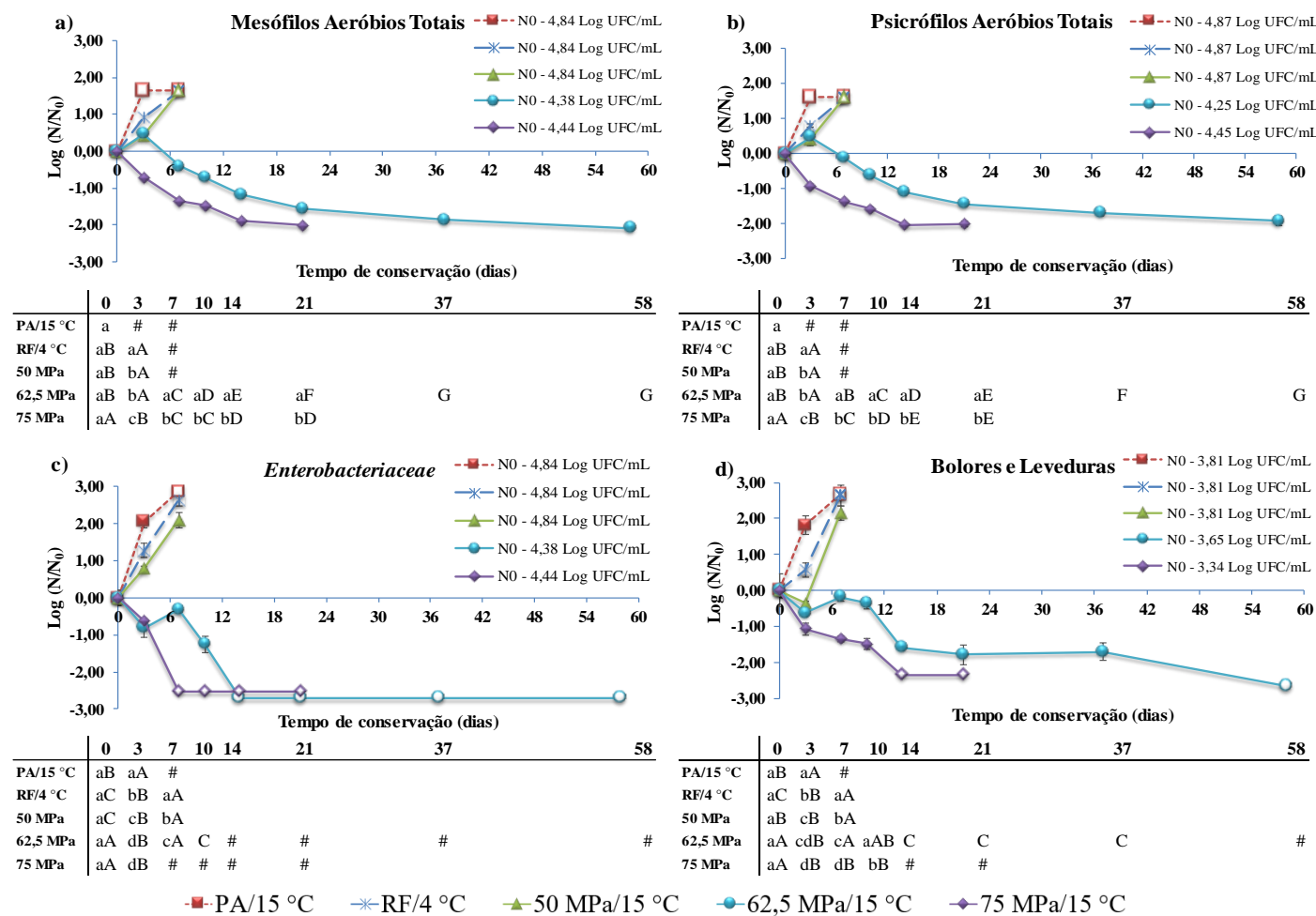


Figura 7 – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 50 MPa/15 °C e 75 MPa/15 °C e 58 dias sob AH a 62,5 MPa/15 °C; e sob pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – G) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d). Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas ≥ 6.5 log UFC/mL ou abaixo do limite de deteção ≤ 1 log UFC/mL.

Nas amostras sob RF, as contagens microbianas aumentaram estatisticamente ($p < 0,05$), tendo-se verificado, no entanto, um menor aumento nas contagens quando comparado com as amostras armazenadas sob PA/15 °C, como pode ser visto na **Figura 7**. Ao 3º dia, verificou-se um incremento nas contagens de 0,9, 0,8, 1,3 e 0,6 unidades logarítmicas para MES, PSI, ENT e BL, respetivamente. No entanto, as amostras RF também atingiram valores acima de 6,0 log UFC/mL para MES e PSI (**Figura 7a-b**) ao 7º dia de armazenamento. Relativamente a ENT e BL (**Figura 7c-d**) também se verificou um aumento significativo ($p < 0,05$) durante o tempo de armazenamento, com um incremento de 1,3 e 2,6 unidades logarítmicas para ENT, após 3 e 7 dias, respetivamente, e 0,6 e 2,6 unidades logarítmicas para BL nos mesmos dias de armazenamento. Estes resultados eram expectáveis sob RF e sob PA/15 °C, uma vez que, o sumo de melancia é um alimento altamente perecível cuja proliferação microbiana é rápida, embora a RF reduza a velocidade do seu desenvolvimento (**Queirós, et al., 2014**) resultando no aumento das contagens microbianas de modo mais lento.

Tendo em conta as amostras AH, os diferentes níveis de pressão aplicados durante o armazenamento mostraram efeitos distintos no desenvolvimento microbiano. Quando foi aplicado o AH a 50 MPa/15 °C, foi observado um crescimento microbiano significativo ($p < 0,05$), mas ao 3º dia de armazenamento os incrementos para todos os microrganismos eram menores do que nas amostras RF. Contudo, ao 7º dia, as contagens microbianas atingiram o limite de aceitabilidade para MES e PSI, tal como aconteceu nas amostras RF. As amostras armazenadas a 62,5 e 75 MPa a 15 °C mostraram uma progressiva redução nas contagens microbianas durante todo o tempo de armazenamento, sendo mais pronunciado nos primeiros dias. Com o AH a 75 MPa/15 °C foi verificado um decréscimo significativo ($p < 0,05$) de 2,0 unidades logarítmicas para MES e PSI e de 2,5 e 2,3 unidades logarítmicas para ENT e BL, respetivamente, no final do período de armazenamento (21 dias). Portanto, foi decidido utilizar uma pressão intermédia para estudar o efeito do AH entre os valores de pressão a que os microrganismos não eram inibidos (50 MPa) nem eram inativados (75 MPa). Assim, com o AH a 62,5 MPa, observou-se de facto que nos primeiros 7 dias de armazenamento os microrganismos apresentaram valores idênticos aos valores iniciais, mas, a partir do 10º dia foi detetada uma inativação microbiana. No 21º dia de armazenamento, ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) em cerca de 1,5 unidades logarítmicas para MES e PSI (**Figura 7a-b**), e cerca de 2,7 e 1,8 unidades logarítmicas para ENT e BL (**Figura**

7c-d), respetivamente. Quando o tempo de armazenamento aumentou para 58 dias, nas amostras a 62,5 MPa/15 °C, foi observado um contínuo e significativo ($p < 0,05$) decréscimo das contagens microbianas com reduções de 2,1, 1,9, 2,7 e 2,6 unidades logarítmicas para MES, PSI, ENT e BL, respetivamente.

Pelos resultados foi possível verificar que as pressões de 62,5 e 75 MPa foram suficientes para causar inativação microbiana enquanto que 50 MPa não foi eficiente para evitar o crescimento de microrganismos. Contrariamente a isto, **Segovia-Bravo, et al. (2012)** reportaram que o AH a 20 °C e 25 MPa por 15 dias reduziu as contagens iniciais de sumo de morango em mais de 2 unidades logarítmicas. Além disso, **Bermejo-Prada, et al. (2016)** observaram que a redução de microrganismos pode ser detetada depois de 15 dias a 50 MPa. Contudo, o sumo de morango é um alimento ácido ($\text{pH} \approx 3,3$), sendo este fator uma barreira intrínseca contra o desenvolvimento microbiano causando uma maior sensibilidade microbiana à inativação por alta pressão. Por outro lado, **Fidalgo, et al. (2014)** observaram que AH a 100 MPa e temperatura não controlada (18 – 21 °C) causou a redução de MES, ENT e BL ao fim de 60 horas, enquanto que à PA, estas contagens estavam acima de 6,0 log UFC/mL depois de 24 horas. Além disso, resultados semelhantes foram descritos por **Pinto, et al. (2016)**, que verificaram que a mesma metodologia (AH a 21 °C e 100 MPa) foi eficiente para provocar o decréscimo de MES e PSI em quase 2,0 unidades logarítmicas ao fim de 7 dias de armazenamento, enquanto que os valores de BL se encontravam abaixo do limite de deteção ($\leq 1,0$ log UFC/mL). Embora neste estudo a pressão utilizada fosse de 100 MPa, que é superior à pressão usada no nosso estudo (75 MPa), o nosso trabalho originou um efeito de inativação microbiana durante os 21 dias de armazenamento, mostrando contagens microbianas inferiores em todos os microrganismos e permitindo um tempo de prateleira de pelo menos 21 dias. Além disso, quando a pressão usada foi 62,5 MPa a 15 °C, foi suficiente para o aumento do tempo de prateleira de pelo menos 58 dias, mostrando as mesmas reduções microbianas ao 58º que as amostras armazenadas a 75 MPa/15 °C durante 21 dias. Por fim, a baixa temperatura usada no nosso estudo (15 °C) ocorre em muitos países e estações do ano onde a temperatura ambiente pode chegar naturalmente a valores substancialmente menores do que a “típica” temperatura ambiente (≈ 25 °C) (**Bermejo-Prada, et al., 2016**).

Com estes resultados é possível concluir que a 15 °C ocorre uma inativação microbiana a pressões baixas, que foi confirmado pelo facto de a 62,5 e 75 MPa ocorrer redução

microbiana, em concordância com os resultados reportados por **Santos, et al. (2014)** que aplicaram o AH a 20 °C em sumo de melancia usando pressões entre 25 – 150 MPa. Estes autores verificaram que quando a pressão usada foi 25 – 50 MPa, nenhum efeito inibitório foi alcançado. Resultados semelhantes foram descritos por **Queirós, et al. (2014)** em sumo de melão. Contudo, é importante ter em consideração que o tempo de armazenamento avaliado por esses estudos foi substancialmente menor (8 – 60 horas) do que o usado no nosso estudo (58 dias), o que indica um aumento do tempo de vida do sumo de melancia considerável. Estes resultados apontam claramente a possibilidade do uso do AH a 15 °C como uma metodologia de conservação de alimentos com custos mínimos para alimentos altamente perecíveis com um aumento substancial do tempo de prateleira comparativamente com RF.

4.1.2. Armazenamento Pós-Hiperbárico a 15 °C

O armazenamento pós-hiperbárico (APH) é o armazenamento de um produto alimentar sob refrigeração, à pressão atmosférica, após ter sido armazenamento sob pressão (condições hiperbáricas). Assim, embora o AH a 62,5 MPa de sumo de melancia tenha originado uma redução da carga microbiana dos microrganismos estudados (**Figura 7**), duas amostras foram colocadas sob APH, após 37 dias sob AH a 62,5 MPa/15 °C e armazenadas sob RF (4 °C) à PA. Desta forma, foi possível avaliar a estabilidade do sumo de melancia após o AH e perceber se os microrganismos se conseguiriam adaptar novamente às condições de pressão e temperatura a que estavam sujeitos normalmente. Os valores do log UFC/mL para os microrganismos estudados estão disponíveis no **Anexo D**.

Os resultados apresentados na **Figura 8**, mostram que os valores da carga inicial para todos os microrganismos foram inferiores aos valores iniciais para os mesmos microrganismos armazenados sob RF (**Figura 7**). Ao fim de 2 dias de APH, nenhum crescimento microbiológico foi verificado para os microrganismos estudados. No entanto, para MES e PSI ocorreu crescimento microbiológico ($p < 0,05$) após 7 dias destes terem sido retirados do armazenamento sob pressão. Relativamente aos BL, foi verificado um comportamento semelhante, já que só apresentaram crescimento significativo ($p < 0,05$) ao fim do 7º dia de armazenamento sob RF.

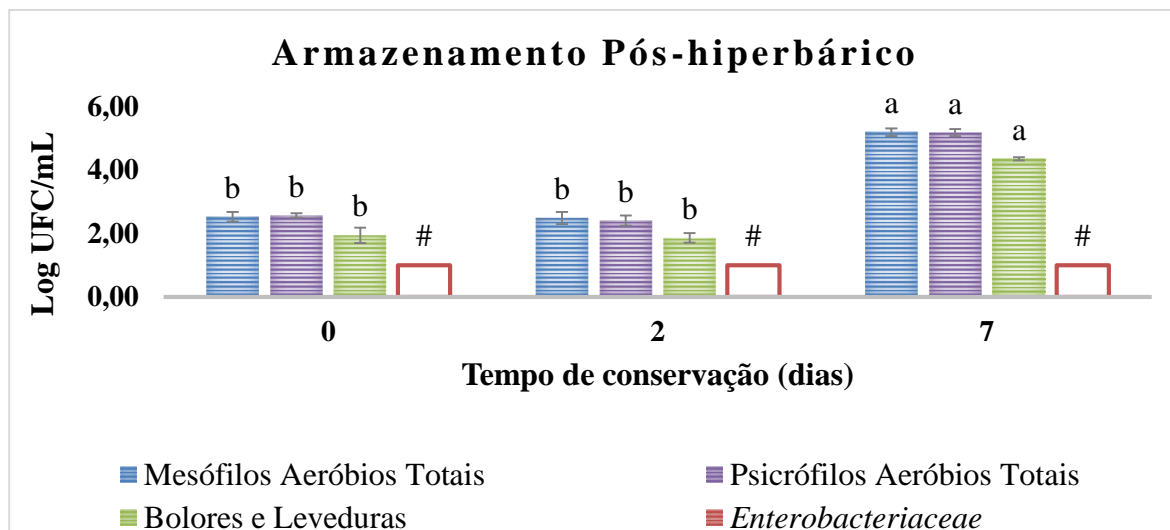


Figura 8 – Armazenamento Pós-Hiperbárico de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) à pressão atmosférica (0,1 MPa). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de APH para cada microrganismo (a – b). Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$.

No que diz respeito a ENT, estas já se encontravam abaixo do limite de deteção no 37º dia de AH a 62,5 MPa/15 °C (representado na **Figura 8** como o dia 0 do APH), e nenhum crescimento foi observado, pois as ENT mantiveram-se abaixo do limite de deteção durante os 7 dias de APH. Estes resultados são justificados pelo efeito de inativação microbiana que ocorre com AH, porque os valores da carga inicial dos microrganismos quando se iniciou o APH eram inferiores aos valores microbiológicos do sumo armazenado apenas sob RF (**Figura 7**). Assim, como sob AH existe um decréscimo das contagens microbianas ao longo do período de armazenamento, quando se coloca sob RF (após AH) os valores iniciais são inferiores quando comparados com o sumo armazenado sob RF sem ter sido previamente armazenado por AH. Contudo, uma vez que se retira o sumo do AH, os microrganismos tentam recuperar a viabilidade e a capacidade de proliferação das suas células (**Bermejo-Prada, et al., 2016**). Os resultados observados estão de acordo com os resultados descritos por **Fidalgo, et al. (2014)** que verificaram que após 7 dias de APH, os valores de MES e BL aumentaram relativamente ao AH a 100 MPa/TA, no entanto, eram inferiores aos valores encontrados ao 7º dia de armazenamento sob RF. Resultados contrários foram obtidos para APH de sumo de morango (armazenado previamente com AH (25 – 220 MPa/ 20 °C) por 15 dias (**Segovia-Bravo, et al., 2012**). Neste caso, nenhum crescimento microbiológico foi observado durante o APH, sendo referido pelos autores que este facto se deveu à redução microbiana durante o AH e ao baixo pH do sumo de morango que constitui uma barreira

adicional à recuperação dos danos que os microrganismos sofreram sob AH. No entanto, quando o produto é retirado da pressão, os microrganismos que sobrevivem podem apresentar efeitos sub-letais e a extensão desses danos é proporcional à pressão aplicada, pois, **Bermejo-Prada, et al. (2016)** verificaram que o APH de sumo de morango a 100 MPa/20 °C apresentou uma variação no crescimento microbiológico ($\log (N/N_0)$) próximo de 0, o que significa que não ocorreu crescimento nem inativação microbiana.

Contudo, estes resultados permitiram concluir que os microrganismos após o AH a 62,5 MPa/15 °C durante 37 dias conseguiram novamente adaptar-se e proliferar quando colocados sob RF e à PA durante 7 dias, o que parece indicar também que o AH permite inibir o desenvolvimento de microrganismos, possivelmente através do efeito da pressão sobre o seu metabolismo ou componentes celulares. Além disso, se o sumo de melancia não for consumido imediatamente após o AH, pode ser armazenado sobre RF aumentando ainda mais o seu prazo de validade já que, a temperatura baixa pode impedir, durante algum tempo, a recuperação das células após os efeitos sub-letais provocados pela pressão (**Bermejo-Prada, et al., 2016; Farkas & Hoover, 2000; Smelt, 1998**).

4.1.3. Armazenamento Hiperbárico a 50 MPa

Para avaliar o efeito combinado entre pressão e temperatura, foram realizados três ensaios a 50 MPa com diferentes temperaturas (10 e 15 °C e TA (≈ 25 °C)). Os resultados podem ser consultados no **Anexo E**. A **Figura 9** representa a variação nas contagens microbianas ($\log (N/N_0)$) de sumo de melancia armazenado sob pressão a diferentes condições de temperatura (50 MPa/10 °C, 50 MPa/15 °C e 50 MPa/TA). Na **Figura 9** é possível verificar que a 50 MPa/TA, o incremento nas contagens microbianas foi significativamente ($p < 0,05$) superior em todos os tempos de armazenamento analisados comparativamente com os outros dois AHs a temperaturas mais baixas, atingindo o limite de aceitabilidade (6,0 log UFC/mL) ao 3º dia para MES e PSI e ao 7º dia para ENT e BL. A 50 MPa/15 °C verificou-se que ocorreu crescimento microbiano, mas os incrementos são significativamente menores ($p < 0,05$) do que a 50 MPa/TA para todos os microrganismos analisados com aumento de 0,43 e 0,42 unidades logarítmicas para MES e PSI ao 3º dia de armazenamento, respetivamente. Neste caso, quer os MES quer os PSI também atingiram o limite de aceitabilidade ao 7º dia de ensaio e, por isso, o ensaio de armazenamento foi terminado nesse dia para estes dois casos.

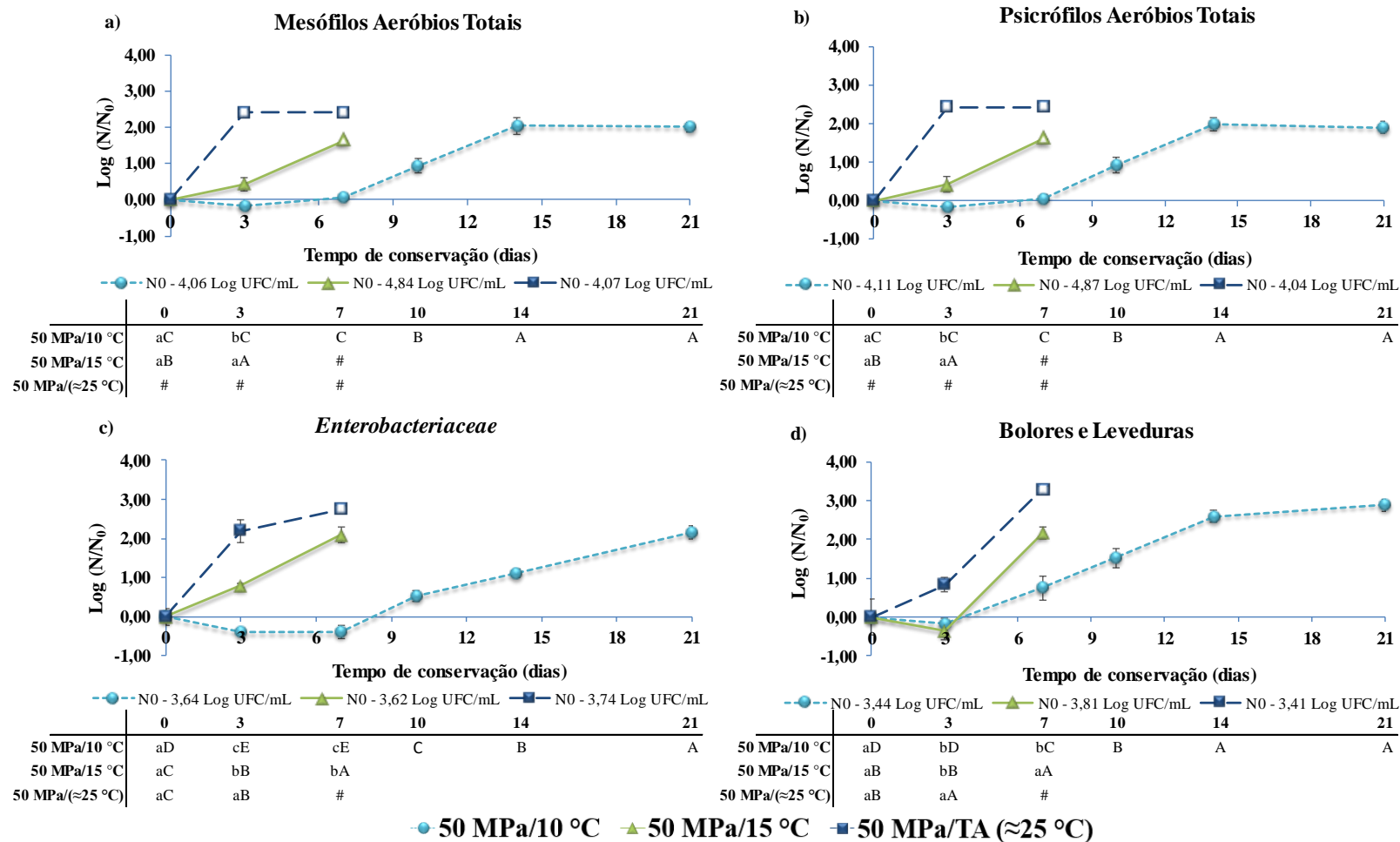


Figura 9 – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 50 MPa, a 10, 15 °C e TA (≈ 25 °C). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – c). Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas ≥ 6.5 log UFC/mL ou abaixo do limite de deteção ≤ 1 log UFC/mL.

Quando se usou o AH de 50 MPa/10 °C verificou-se que nos primeiros 7 dias, as contagens microbianas de MES e PSI se mantiveram constantes ($p > 0,05$), o que indica que ocorreu uma inibição microbiana durante esse período de tempo. Assim, decidiu-se aumentar o tempo de armazenamento para 21 dias, verificando-se um aumento significativo ($p < 0,05$) até ao 14º dia de armazenamento, mantendo-se de novo constante ($p > 0,05$) no 21º dia de ensaio, com um incremento nas contagens de 2,01 e 1,90 unidades logarítmicas para MES e PSI, respetivamente. Para ENT verificou-se uma inativação microbiana até ao 7º dia de ensaio, visto que existiu um decréscimo significativo ($p < 0,05$) nas contagens microbianas de 0,39 unidades logarítmicas, ocorrendo depois crescimento significativo ($p < 0,05$) até ao último dia de ensaio com um incremento de 2,16 unidades logarítmicas. Mais uma vez se verificou que as ENT são, dos microrganismos analisados, os mais suscetíveis à pressão já que apresentaram redução ao 3º e 7º dias de armazenamento com AH de 50 MPa/10 °C. No caso dos BL, foi encontrado um comportamento semelhante aos outros microrganismos obtendo-se uma inibição microbiana nos primeiros 3 dias de armazenamento com decréscimo de 0,18 unidades logarítmicas e posteriormente um crescimento significativo ($p < 0,05$) até ao 21º dia de armazenamento com um incremento de 2,88 unidades logarítmicas. Estes resultados mostraram claramente o efeito da temperatura no AH a 50 MPa, sendo possível verificar que quanto maior a temperatura, maior e mais rápido foi o crescimento microbiano a este nível de pressão. Da mesma forma, foi possível concluir que o AH a 50MPa/15 °C e 50MPa/TA não foram eficazes na inibição do crescimento microbiano pois verificaram-se incrementos positivos ao longo do tempo de armazenamento, sendo maiores no AH a 50 MPa/TA. Estes resultados estão em concordância com **Santos, et al. (2014)** que reportara, que a 25 e 30 °C, era necessário 75 MPa para ocorrer inativação microbiana já que, a 50 MPa, apenas se verificava uma inibição em 8 horas. Além disso, em sumo de melão, foi observado também inibição microbiana com AH a 50 MPa/25 °C (**Queirós, et al., 2014**). No entanto, estes dois autores afirmaram que o AH era independente da temperatura (mas o estudo só teve 8 horas) contrariamente ao que foi observado no nosso estudo (21 dias) já que, a 10 °C, se verificaram melhores resultados do que a 15 °C ou à TA como se observa na **Figura 9**. Além disso, o AH a 50 MPa/10 °C foi eficaz na inibição do crescimento microbiano durante os primeiros 7 dias de armazenamento. Este período de tempo pode permitir que os microrganismos que resistem a este AH se adaptem às novas condições de pressão e temperaturas sujeitos e a partir daí, se consigam desenvolver

ocorrendo crescimento microbiano nos dias seguintes de armazenamento, como se verifica pela observação da **Figura 9**. Assim, a 50 MPa, o efeito da temperatura foi evidente e fundamental no processo de inibição/crescimento microbiano que, a este nível de pressão, foi dependente da temperatura de armazenamento, sendo que quanto menor for a temperatura menor foi o crescimento microbiano.

4.1.4. Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa

Para avaliar o efeito combinado entre pressão e temperatura, foram realizados mais dois ensaios a 75 MPa com diferentes temperaturas (15 °C e TA (\approx 25 °C)). Os resultados estão incluídos no **Anexo F**. A **Figura 10** representa a variação nas contagens microbianas ($\log(N/N_0)$) de sumo de melancia armazenado sob AH a 75 MPa com diferentes condições de temperatura (75 MPa/15 °C e 75 MPa/TA). Com o AH de 75 MPa/TA verificou-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) nas contagens microbianas ao longo do tempo de armazenamento. Ao 7º dia de armazenamento, houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) de 1,51 e 1,59 unidades logarítmicas para MES e PSI (**Figura 10a-b**), mantendo-se constante até ao 10º dia de armazenamento. No entanto, existiu um novo decréscimo nas contagens para MES e PSI de 1,87 e 1,85 respetivamente, ao 21º dia de armazenamento, sendo que ao 62º dia os valores já se encontravam abaixo do limite de deteção. Relativamente a ENT (**Figura 10c**), existiu um decréscimo significativo ($p < 0,05$) ao 3º dia de armazenamento de 0,74 unidades logarítmicas atingindo o limite de deteção ($\leq 1 \log \text{UFC/mL}$) ao 7º dia de armazenamento e permanecendo assim até ao final do tempo de armazenamento testado. Os BL (**Figura 10d**) apresentaram comportamento semelhante aos MES e PSI obtendo-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo, atingindo o limite de deteção ao 14º dia de armazenamento mantendo-se assim até ao último dia de ensaio. Quando se diminuiu a temperatura para 15 °C, os resultados obtidos foram semelhantes para todos os microrganismos testados. Na **Figura 10a-b**, verificou-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) das contagens microbianas para MES e PSI de 0,70 e 0,93 unidades logarítmicas ao 3º dia de armazenamento, respetivamente. No 7º dia de ensaio, o decréscimo observado foi de 1,36 e 1,38 unidades logarítmicas para MES e PSI, respetivamente, não se verificando diferenças significativas ($p > 0,05$) para estes microrganismos ao 10º dia de armazenamento. No entanto, verificou-se novamente um decréscimo significativo ($p < 0,05$) ao 21º dia de armazenamento obtendo-se reduções de 2,01 e 2,00 unidades logarítmicas.

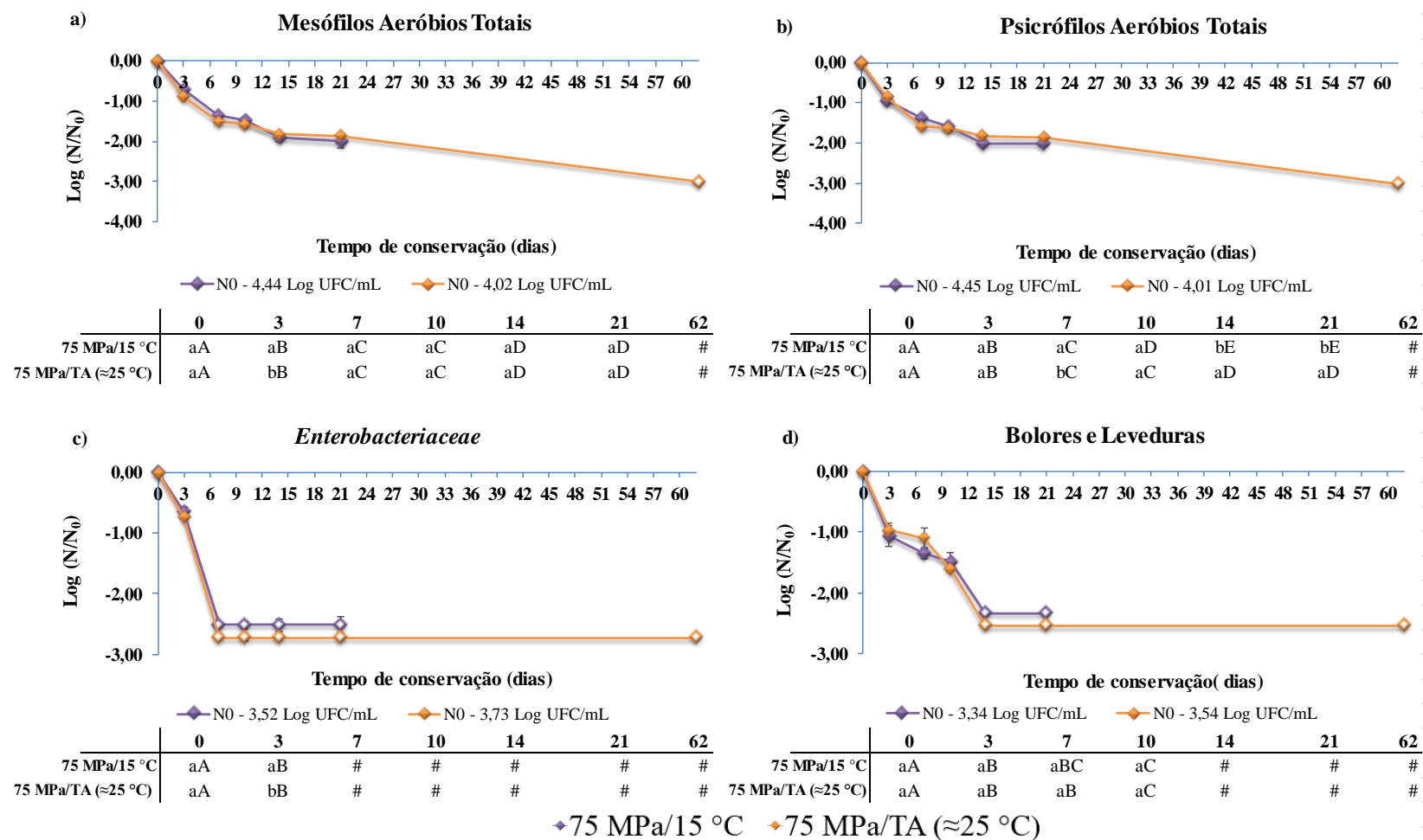


Figura 10 – Crescimento microbiano de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 21 dias de armazenamento sob: AH a 75 MPa, a 15 °C e TA (≈ 25 °C). N0 - valor da carga microbiana inicial para cada condição. Valores positivos e negativos indicam crescimento ou inativação microbiana, respetivamente. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b). Símbolos sem preenchimento e # - contagens microbianas ≥ 6.5 log UFC/mL ou abaixo do limite de deteção ≤ 1 log UFC/mL.

No que diz respeito a ENT, verificou-se novamente um decréscimo significativo ($p < 0,05$) progressivo até valores abaixo do limite de deteção ao 7º dia de armazenamento. Quanto aos BL, verificou-se uma redução nas contagens microbianas tal como aconteceu a 75 MPa/TA. No 3º dia de armazenamento verificou-se uma redução de 1,07 unidades logarítmicas que continuaram a diminuir significativamente ($p < 0,05$) e ao 10º dia já existia uma redução de 1,48 unidades logarítmicas. Ao fim de 14 dias de armazenamento a 75MPa/15 °C, os BL já se encontravam abaixo do limite de deteção mantendo-se assim até ao 21º dia de armazenamento. Pela **Figura 10** verificou-se ainda que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre 75 MPa/TA e 75 MPa/15 °C para MES e PSI durante os 21 dias de armazenamento, exceto no dia 3 e 7 em que apesar de serem diferentes estatisticamente ($p < 0,05$) entre as duas condições para estes microrganismos, os valores foram muito próximos. Em relação às ENT, verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) ao 3º dia de ensaio, mas em ambos os casos, os valores encontraram-se abaixo do limite de deteção a partir do 7º dia de armazenamento. Relativamente a BL, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os dois tipos de armazenamento ao longo de todo o AH. Com estes resultados foi possível verificar que com o AH a 75 MPa, não existiu efeito da temperatura para as duas temperaturas estudadas (15 °C e TA (≈ 25 °C)). Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por **Santos, et al. (2014)** que descreveram que com o AH a 75 MPa/(25 – 30 °C), os resultados microbiológicos foram iguais ou melhores do que sob RF, independentemente da temperatura usada, apesar da temperatura mínima utilizada nesse estudo ter sido 25 °C. Além disso, os mesmos autores verificaram que a 100 MPa, nenhum efeito significativo da temperatura foi observado nas contagens microbianas em sumo de melancia (**Santos, et al., 2014**). O mesmo foi detetado em sumo de melão por **Queirós, et al. (2014)** que apuraram que entre 25 – 37 °C, o efeito do AH a 50, 75, 100 e 150 MPa na inibição/inativação microbiana é independente da temperatura e é maior quanto maior a pressão usada. Os resultados desta dissertação vêm acrescentar informação a este estudo pois confirmou-se que com o AH a 50 MPa, a temperatura foi um fator determinante no crescimento microbiano, como já foi discutido no tópico anterior. Assim, foi possível concluir que, com 50 MPa, quanto menor a temperatura maior é o efeito de inibição do crescimento de microrganismos observado, ou seja, com o AH a 50 MPa/10 °C o desenvolvimento é menos acelerado do que a 50 MPa/15 °C, e com 50 MPa/TA (≈ 25 °C) o crescimento microbiano é mais acelerado como se verifica na **Figura 9**. No sentido

contrário, verificou-se que com o AH a 75 MPa, o efeito de inibição/inativação microbiana foi independente das duas temperaturas testadas (15 °C e TA (\approx 25 °C)) como se observa na **Figura 10**. Com a conjugação destes resultados, foi possível concluir que a 50 MPa, a temperatura foi essencial no controlo do crescimento microbiano. No entanto, após 7 dias, os microrganismos começaram a desenvolver-se. Para pressões de 75 MPa e acima, a pressão pode ser o fator chave na inibição/inativação microbiana independentemente da temperatura utilizada uma vez que não se observaram diferenças significativas entre o armazenamento hiperbárico a 75 MPa às duas temperaturas testadas (15 °C e TA (\approx 25 °C)).

4.1.5. Armazenamento Hiperbárico a 100 MPa/TA

O sumo de melancia cru foi exposto ao ar e à TA (\approx 25 °C) durante 7 dias para mimetizar um sumo com elevada carga microbiana intrínseca, sendo de seguida embalado nas condições detalhadas nos materiais e métodos. Com este pressuposto, pretendeu-se avaliar a eficácia do AH na inativação microbiana de um sumo com contagens microbianas iniciais elevadas, sendo para isso realizado um AH a 100 MPa à TA (\approx 25 °C). Os valores do AH à TA estão apresentados no **Anexo G**. A **Figura 11** representa a evolução da carga microbiana (log UFC/mL) com o decorrer do tempo de armazenamento sob pressão.

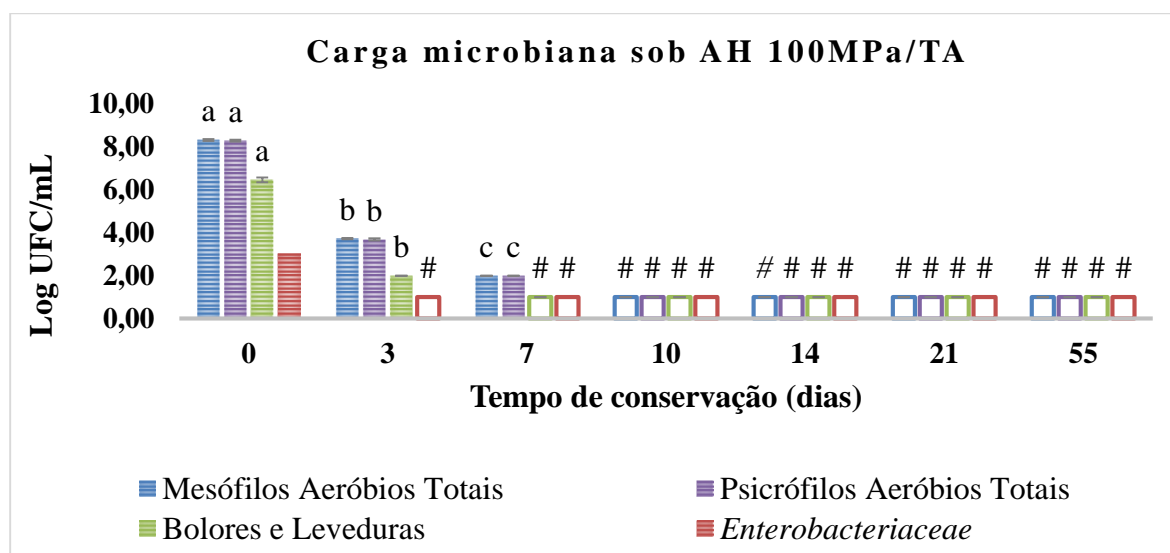


Figura 11 – Evolução da carga microbiana de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 55 dias de armazenamento sob: AH a 100 MPa/TA (\approx 25 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada microrganismo (a – c). Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção ≤ 1 log UFC/mL.

Pela observação da **Figura 11** foi possível verificar que a carga microbiana inicial do sumo de melancia, para MES e PSI, é elevada ($\approx 8,30 \log \text{UFC/mL}$) como era de esperar já que o sumo de melancia ficou exposto à TA durante 7 dias. No entanto, observou-se também que com o decorrer do tempo sob AH a 100 MPa, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nas contagens microbianas para todos os microrganismos testados. Além disso, os resultados foram semelhantes tanto para MES como PSI, onde se verificou uma redução significativa ($p < 0,05$) de aproximadamente 4,6 unidades logarítmicas, do dia inicial para o 3º dia de AH, em ambos os casos. Do 3º para o 7º dia, também se verificou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de cerca de 1,7 $\log \text{UFC/mL}$ para MES e PSI. A partir do 10º dia, verificou-se que, para estes microrganismos, as contagens se encontraram abaixo do limite de deteção ($\leq 1 \log \text{UFC/mL}$). No que diz respeito aos BL obteve-se um decréscimo significativo ($p < 0,05$) das contagens ao longo do tempo de AH, sendo que, foi observado uma redução de aproximadamente 4,5 unidades logarítmicas do dia inicial para o 3º dia de AH. A partir do 7º dia, os BL encontravam-se abaixo do limite de deteção. Com o AH a 100 MPa/TA verificou-se ainda que as ENT se encontravam abaixo do limite de deteção logo ao 3º dia de ensaio mantendo-se assim até ao fim do armazenamento (55 dias). Resultados idênticos foram descritos com AH a 100 e 200 MPa à TA em sumo de morango onde foram observados reduções significativas, ao fim de 1 dia de AH, para MES e BL de 1,4 e 1,0 unidades logarítmicas e 3,6 e 3,1 unidades logarítmicas, respetivamente (**Bermejo-Prada, et al., 2016**). No mesmo sentido, **Pinto, et al. (2016)** detetaram que com AH a 100 MPa/21 °C, causou uma redução de cerca de 2,0, 2,0 e 2,6 unidades logarítmicas para MES, PSI e BL ao fim de 7 dias, respetivamente. Contudo, ambos os estudos utilizaram como amostram sumo cru preparado em condições de minimizar o crescimento microbiano, contrariamente ao nosso caso onde o objetivo foi verificar a inativação que ocorria quando o sumo de melancia já estaria acima do limite de aceitabilidade ($> 6,0 \log \text{UFC/mL}$).

Com estes resultados, concluiu-se claramente que ocorre inativação microbiana a 100 MPa/TA, com uma redução rápida das contagens dos microrganismos testados promovendo inativação microbiana do sumo de melancia e não se verificando crescimento em pelo menos 55 dias, o que é muito superior ao encontrado descrito na literatura (8 horas (**Santos, et al., 2014**), 60 h (**Fidalgo, et al., 2014**) e 7 dias (**Pinto, et al., 2016**)). Além disso, com este nível de pressão aplicada (100 MPa), os efeitos sob os microrganismos são mais rápidos originando uma redução microbiana acentuada como se pode concluir pela redução de 7,3

log UFC/mL para MES e PSI ao fim de 10 dias de AH. Estes resultados confirmaram a eficácia do AH na inibição/inativação microbiana que ocorre com um nível de pressão de 100 MPa já verificado por diversos autores quer para sumo de melancia (**Fidalgo, et al., 2014; Santos, et al., 2014**), quer para outros produtos alimentares (**Tabela 2**), permitindo aumentar o tempo de vida útil dos produtos. Além disso, a temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) utilizada durante este ensaio não foi controlada o que permite um aumento na poupança energética que é possível obter com a utilização desta metodologia de conservação alimentar à temperatura ambiente não controlada.

4.1.6. Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa/TA

Com o objetivo de estudar o efeito do AH sobre as bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE), foi realizado um ensaio em que a pressão utilizada foi a pressão mínima suficiente para causar inativação microbiana independentemente da temperatura utilizada (75 MPa) de acordo com os resultados apontados já neste trabalho, para minimizar os custos associados ao armazenamento. Os resultados do AH a 75 MPa/TA estão contemplados no **Anexo G**. Os esporos são produzidos por algumas BMFE como uma estratégia de sobrevivência em condições ambientais adversas como (pH, temperatura, ausência de água ou nutrientes), germinando apenas quando o ambiente lhes for favorável. Além disso, estes apresentam elevada resistência a tratamentos térmicos, radiação e alguns químicos (**Soni, Oey, Silcock, & Bremer, 2016**). Por esse motivo, o sumo de melancia foi exposto ao ar e à TA durante 7 dias para permitir o crescimento e desenvolvimento das BMFE bem como a possível produção de esporos. De seguida, o sumo foi sujeito a um tratamento térmico a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min para a eliminação das bactérias vegetativas (**Ziane, et al., 2014**) como descrito nos materiais e métodos. No entanto, com a metodologia utilizada, não é possível garantir que o sumo de melancia continha esporos, já que exigia que se confirmasse a sua presença, mas de acordo com **Ziane, et al. (2014)**, após a aplicação do tratamento térmico anteriormente referido, só deverão sobreviver os esporos.

Através da **Figura 12** é possível observar-se, no dia 0, a contagem de 3,22 log UFC/mL de BMFE o que indica a germinação dos esporos possivelmente formados durante a exposição do sumo ao ar, mas, passados 3 dias de AH as BMFE já apresentavam valores abaixo do limite de deteção do método ($\leq 1\text{ log UFC/mL}$), mantendo-se assim até ao último

dia de ensaio (55 dias). Portanto, o AH a 75 MPa/TA foi eficiente na inativação das BMFE durante o tempo de armazenamento do sumo de melancia. Além disso, como as BMFE são responsáveis pela formação de esporos e não foi verificado nenhum crescimento microbiano durante o AH, isto pode indicar que não ocorre o desenvolvimento de esporos que possam ter sido formados aquando da exposição do sumo à temperatura ambiente e ao ar, o que tem que ser confirmado em estudos posteriores.

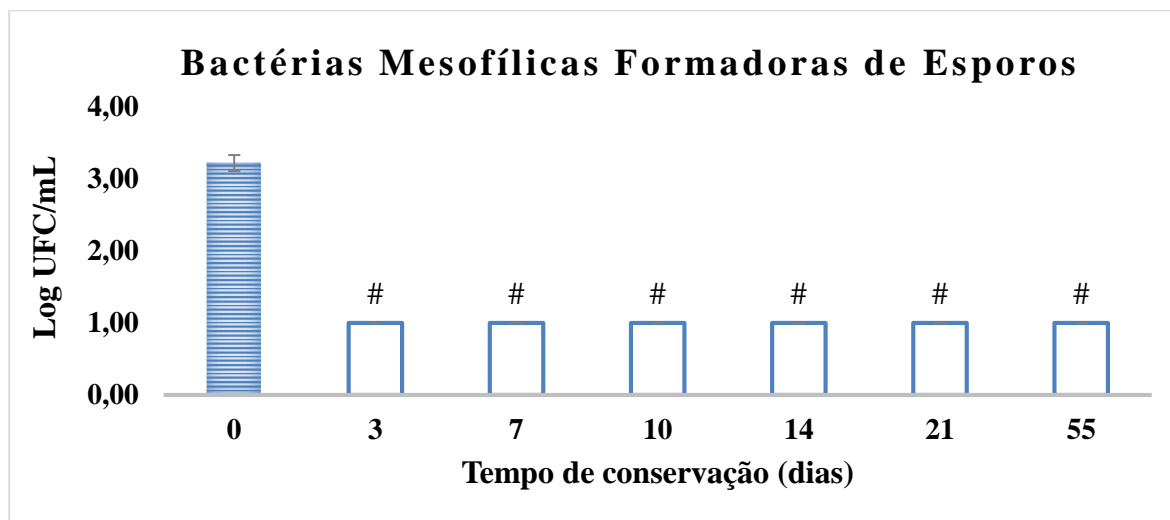


Figura 12 – Efeito do AH a 75 MPa/TA ($\approx 25^\circ\text{C}$) sob as Bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE) durante 55 dias de armazenamento. Barras sem preenchimento e # - contagens microbianas abaixo do limite de deteção $\leq 1 \log \text{UFC/mL}$.

Na literatura há apenas dois estudos sobre o armazenamento de esporos sob pressão (Aoyama, Shigeta, Okazaki, Hagura, & Suzuki, 2004, 2005), onde os autores descrevem que ocorre a redução das contagens de diferentes esporos *Bacillus* sp cultivados em meio de cultura *gifu anaerobic broth* (GAM Broth), com o AH entre 40 – 60 MPa/40 e 55 $^\circ\text{C}$ por 24 e 48 horas, com reduções que variam entre 1,0 e 5,8 $\log \text{UFC/mL}$. Estes dois estudos suportam os resultados obtidos nesta dissertação, já que não se observou desenvolvimento de esporos apesar do sumo de melancia ser uma matriz muito complexa quando comparado com o meio de crescimento usado nestes artigos.

4.2. Análise Físico-Química

4.2.1. Armazenamento Hiperbárico a 15 °C

a) pH, sólidos solúveis totais e turbidez

Na **Figura 13**, pode observar-se a evolução do pH, SST e turbidez do sumo de melancia conservado nas diferentes condições de pressão e a 15 °C (AH/15 °C), e à pressão atmosférica sob refrigeração a 4 °C (RF) e a 15 °C (PA/15 °C) durante o tempo de armazenamento (21 dias). Os resultados em forma de tabela são apresentados no **Anexo H**. Os valores dos parâmetros físico-químicos só foram realizados durante 21 dias e não durante 58 dias como aconteceu no ensaio microbiológico a 62,5 MPa/15 °C devido ao limite de volume no equipamento de AP utilizado para obter as amostras nas quais se realizaram as análises físico-químicas. O valor do pH inicial variou entre 6,50 e 6,57 (**Tabela 3**) e as amostras armazenadas sob PA (RF e PA/15 °C) apresentaram valores de pH significativamente mais baixos ($p < 0,05$) (**Figura 13a**), sendo que a PA/15 °C apresentou um valor de pH de $4,16 \pm 0,04$ ao fim do 3º dia, alcançando um valor mínimo de $3,50 \pm 0,09$ após 21 dias, provavelmente devido à alta carga microbiana presente nestas amostras durante o armazenamento como está representado na **Figura 7** e foi discutido anteriormente. As amostras RF, mantiveram o pH durante os primeiros 7 dias, diminuindo ligeiramente ao dia 10 e mostrando uma redução significativa ($p < 0,05$) ao 14º dia ($4,79 \pm 0,01$) e ao 21º dia ($4,18 \pm 0,03$).

Relativamente ao AH, quando se realizou o armazenamento a 50 MPa/15 °C, foi observado um comportamento semelhante ao RF, mantendo o pH durante os 7 dias do ensaio testados. Quando se aumentou o nível de pressão para 62,5 MPa, o pH manteve-se aproximadamente constante durante os 21 dias de armazenamento, pois não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao longo do tempo. A 75 MPa/15 °C, foi observado um comportamento semelhante onde foi apenas verificado uma variação significativa ($p < 0,05$) no último dia de armazenamento com um decréscimo de $6,38 \pm 0,03$ (dia 14) para $6,33 \pm 0,00$ (dia 21). Estes resultados estão de acordo com os resultados observados por **Pinto, et al. (2016)** que verificaram uma maior variação no pH a 21 °C e PA e a manutenção do pH em condições de AH a 100 MPa/21 °C durante 7 dias de armazenamento. Estes resultados indicam que AH a 62,5 – 75 MPa/15 °C foi eficiente na estabilização dos valores de pH do

sumo de melancia durante 21 dias, possivelmente devido à inibição/inativação microbiológica verificada nestas duas condições de AH.

Tendo em conta os SST (**Figura 13b**), os valores iniciais variaram entre 9,75 – 9,80 °Brix, semelhantes aos reportados na literatura (9,6 – 9,7 °Brix) por **Arocho, et al. (2012)** e **Liu, et al. (2012)**. Em sumo de frutos, o conteúdo em SST está relacionado com a concentração de açúcares presentes nos frutos e é altamente dependente do estado de maturação e variedade de melancia usada (**Arocho, et al., 2012**). Para os SST, foi verificado um padrão semelhante ao pH, com um decréscimo dos seus valores ao longo dos 21 dias de armazenamento a PA/15 °C e RF. Durante o armazenamento a PA/15 °C, os SST diminuíram progressivamente ($p < 0,05$) alcançando um valor mínimo de $8,50 \pm 0,09$ °Brix após 21 dias. O decréscimo observado pode estar relacionado com o crescimento microbiano já indicado anteriormente, que provocam o consumo dos açúcares presentes no sumo, também descrito nas mesmas amostras por outros autores (**Pinto, et al., 2016**). Relativamente ao armazenamento por RF, o °Brix manteve-se constante durante os 10 dias ($p > 0,05$), mas depois, ocorreu uma diminuição significativa ($p < 0,05$) para valores de $9,20 \pm 0,05$ °Brix após 21 dias. Por outro lado, o AH a 15 °C, apresentou uma ligeira tendência decrescente no °Brix durante o período de armazenamento independentemente do nível de pressão aplicado embora, não se tivesse observado diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os diferentes níveis de pressão.

Os valores de turbidez iniciais estão apresentados na **Tabela 3** e variaram entre 0,812 – 0,851. O armazenamento com PA/15 °C mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) relativamente ao valor inicial para valores de $1,232 \pm 0,105$ (**Figura 13c**) logo após 3 dias de armazenamento, com este valor a permanecer inalterado ($p > 0,05$) até ao fim do tempo de armazenamento do ensaio (21 dias). Para as amostras RF, a turbidez só apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) após o 14º e 21º dias de armazenamento com valores de $1,059 \pm 0,019$ e $1,165 \pm 0,032$, respetivamente. O aumento da turbidez nos sumos pode ser explicado pelo desenvolvimento microbiano e consequentemente do número de células microbianas. Contudo, sob condições de AH, a turbidez manteve-se estável, apresentando uma tendência decrescente durante os 21 dias de armazenamento, embora com valores muito próximos dos valores iniciais. Neste sentido, nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) foi observada entre as diferentes pressões usadas. Além disso, mudanças na turbidez em sumos de frutos durante o seu armazenamento são normalmente associadas à ação catalítica de duas

enzimas, a pectina metil esterase (PME) e poligalacturonase (PG). A ação destas enzimas pode alterar a viscosidade de sumos originando a sedimentação dos mesmos, causando a redução da turbidez (Segovia-Bravo, et al., 2012). Bermejo-Prada, Segovia-Bravo, et al. (2015) verificaram que não existiu inibição da PME durante o AH a 200 MPa/15 °C durante 15 dias o que possivelmente causou a degradação das pectinas do sumo e consequente alteração da sua turbidez.

Os parâmetros físico-químicos representados na **Figura 13** mostraram claras alterações em todos os parâmetros ao 3º dia de armazenamento sob PA/15 °C. As amostras RF apresentaram um melhor comportamento e só ao 10º dia de armazenamento foi verificado uma variação nos parâmetros físico-químicos o que pode ser explicado pelos elevados níveis de microrganismos observados ao 7º dia que se verificou na análise microbiológica (**Figura 7**). Por outro lado, com AH a 62,5 e 75 MPa observou-se uma melhor manutenção destes parâmetros, apresentando valores semelhantes aos valores iniciais do sumo, provavelmente devido ao decréscimo observado na carga microbiológica durante os 21 dias de armazenamento.

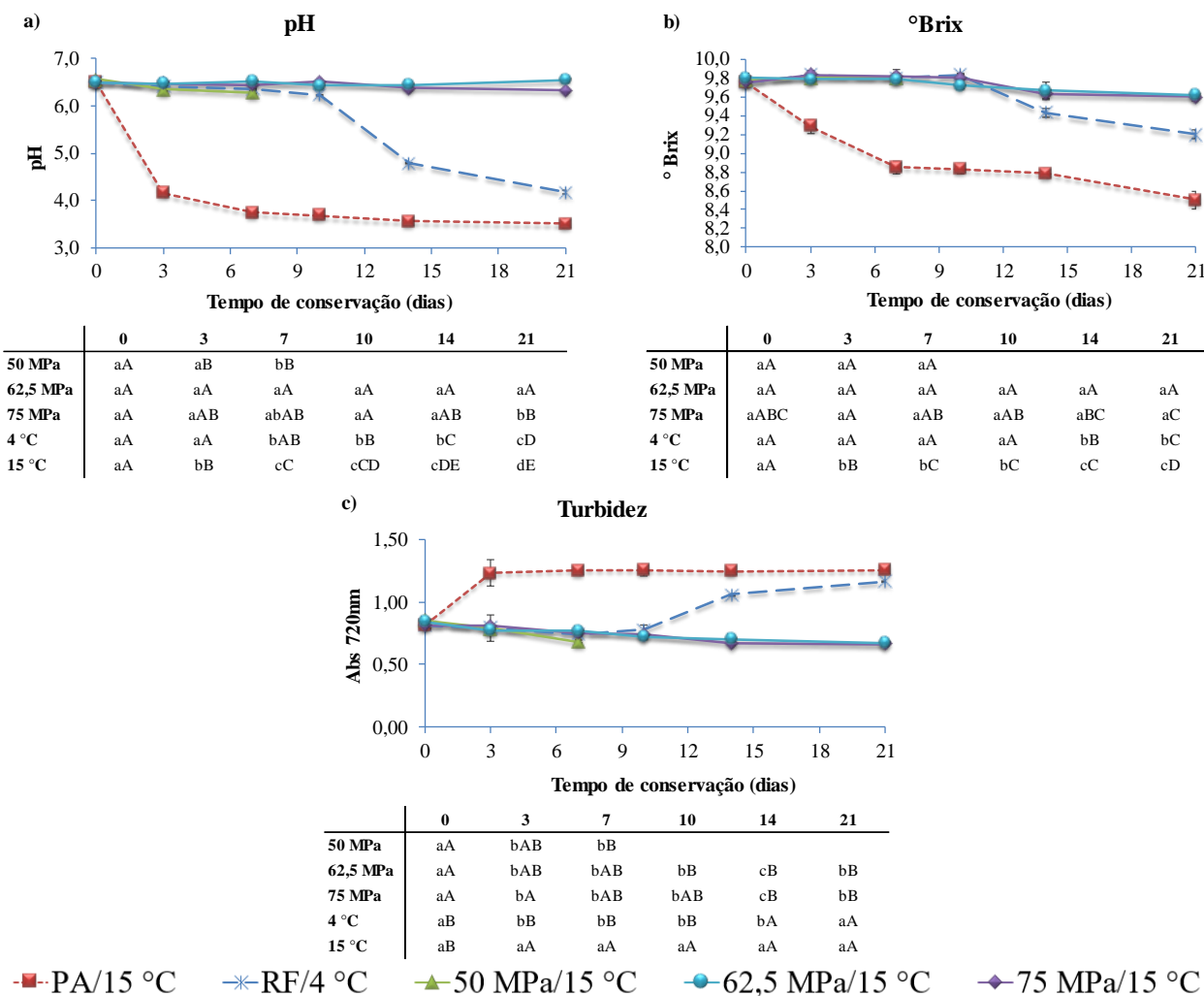


Figura 13 – pH, sólidos solúveis totais (SST) e turbidez para sumo de melancia armazenado durante 21 dias sob: AH a 50, 62,5 e 75 MPa a 15 °C; e a pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d).

b) Cor

A cor é um indicador de qualidade do sumo de melancia, sendo a sua cor vermelha uma característica que influencia a decisão de compra por parte dos consumidores. Os valores dos parâmetros colorimétricos medidos neste estudo, L^* , a^* , b^* , variam entre 35,18 – 35,63, 14,74 – 15,33 e 8,04 – 8,83 (**Tabela 3**), respetivamente, e são análogos aos obtidos por **Fidalgo, et al. (2014)**.

A diferença total de cor (ΔE^*) (**Figura 14d**), de sumo de melancia armazenado a PA/15 °C aumentou de 2,1 ao 3º dia para 3,6 ao 21º dia apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação às outras condições de armazenamento (AH e RF). Com o armazenamento por RF, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) de ΔE^* ao 14º e 21º dia de armazenamento, principalmente devido ao decréscimo observado no valor de a^* e b^* (**Figura 14a-b**). Tendo em conta o AH, a pressão de 75 MPa apresentou menores valores de ΔE^* , o que pode ser justificado pela estabilidade observada nos valores dos parâmetros a^* e b^* durante todo o tempo de armazenamento. Contudo, foi observado um aumento do L^* quando comparado com o valor inicial, sendo este comportamento já reportado na literatura (**Fidalgo, et al., 2014**). Relativamente ao AH a 62,5 MPa, foi verificado maiores valores de ΔE^* do que a 75 MPa, mas o aumento dos valores foi menos pronunciado do que sob RF. No entanto, ao 21º dia de armazenamento, o valor ΔE^* do AH a 62,5 MPa e RF são idênticos ($p > 0,05$).

Diferenças encontradas na cor dos sumos de frutos durante o armazenamento estão fortemente relacionados com a atividade de enzimas como a polifenoloxidase (PPO) e a peroxidase (POD) (**Chisari, et al., 2009**). Assim, será importante estudar a atividade destas enzimas para perceber o seu impacto real nas alterações da cor durante o armazenamento do sumo de melancia.

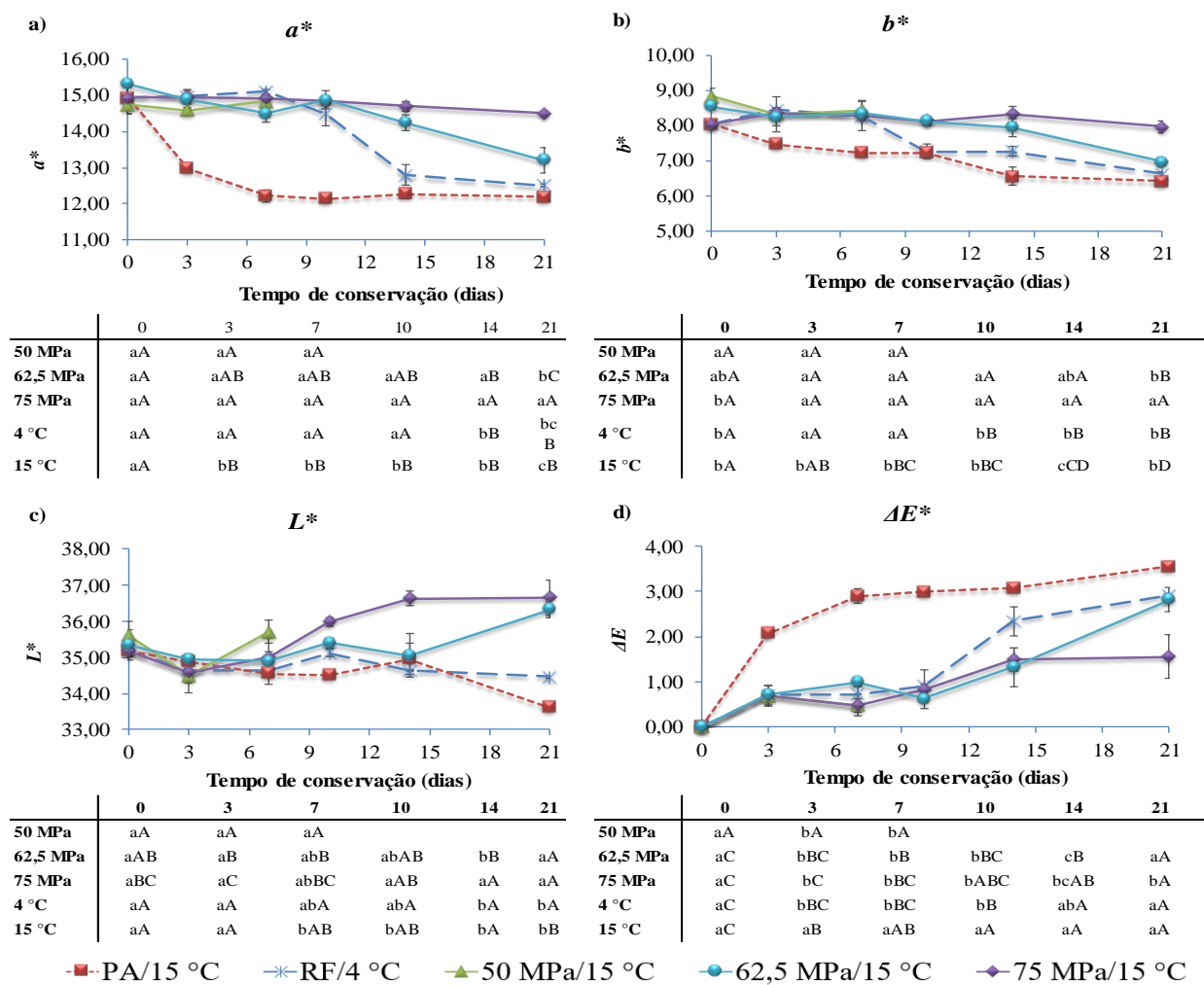


Figura 14 – Parâmetros colorimétricos instrumentais (CIE Lab) e diferença de total de cor (ΔE^*) para sumo de melancia armazenado durante 21 dias sob: AH a 50, 62,5 e 75 MPa a 15 °C; e a pressão atmosférica (PA) sob refrigeração (RF/4 °C) e a 15 °C (PA/15 °C). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – E) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – d).

4.2.2. Armazenamento Hiperbárico a 75 MPa

a) pH, sólidos solúveis totais e turbidez

Nas **Figura 15** pode observar-se a evolução dos parâmetros físico-químicos de sumo de melancia a 75 MPa e a duas temperaturas de 15 °C e TA (≈ 25 °C), durante 21 dias e 62 dias de armazenamento, respetivamente. Os valores podem ser consultados na integra no **Anexo I**. O tempo de armazenamento a 15 °C foi apenas 21 dias devido ao volume de amostra que era possível colocar no equipamento de AP na qual foram armazenadas as amostras a 15 °C. No caso do AH a TA, o volume do equipamento de AP usado era maior o que permitiu a colocação de um maior número de amostras para análise posterior.

O valor de pH inicial do AH a 75 MPa/15 °C e do AH 75 MPa/TA foi de $6,50 \pm 0,02$ e $6,54 \pm 0,03$, respetivamente, não sendo estatisticamente diferentes ($p > 0,05$). Relativamente ao AH a 75 MPa/TA verificou-se uma ligeira tendência crescente do pH ao longo dos 62 dias de armazenamento (**Figura 15a**). No entanto, nos primeiros 21 dias de AH a 75 MPa/TA os valores obtidos mantiveram-se constantes ($p > 0,05$). Quando se diminuiu a temperatura de armazenamento para 15 °C foi observado uma variação significativa ($p < 0,05$) apenas no último dia de AH a 75 MPa/15 °C com um ligeiro decréscimo de $6,38 \pm 0,03$ (dia 14) para $6,33 \pm 0,00$ (dia 21). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por **Pinto, et al. (2016)** que verificou uma maior variação no pH à TA (≈ 21 °C). Entre os dias 7 e 21 verificou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as duas condições de armazenamento (75 MPa/15 °C e 75 MPa/TA), no entanto, os valores de pH são próximos e aceitáveis para o sumo de melancia. Estes resultados indicaram que AH a 75 MPa/15 °C e 75 MPa/TA foram eficientes na estabilização do pH do sumo. No entanto, verifica-se que o AH à TA causou um ligeiro aumento do pH ($p < 0,05$) contrariamente ao que aconteceu com o AH a 15 °C que originou um ligeiro decréscimo ($p < 0,05$) de pH ao 21º dia de armazenamento ($6,60 \pm 0,01$ e $6,33 \pm 0,00$, respetivamente). Comparando estes resultados com os valores obtidos a PA/15 °C e RF (**Figura 13a**) na qual o pH atingiu um valor mínimo de $3,50 \pm 0,09$ e $4,18 \pm 0,03$ após 21 dias, respetivamente, é possível concluir que o AH a 75 MPa apresentou uma eficiência muitíssimo mais elevada na manutenção do pH do sumo de melancia, independentemente da temperatura utilizada nos nossos testes.

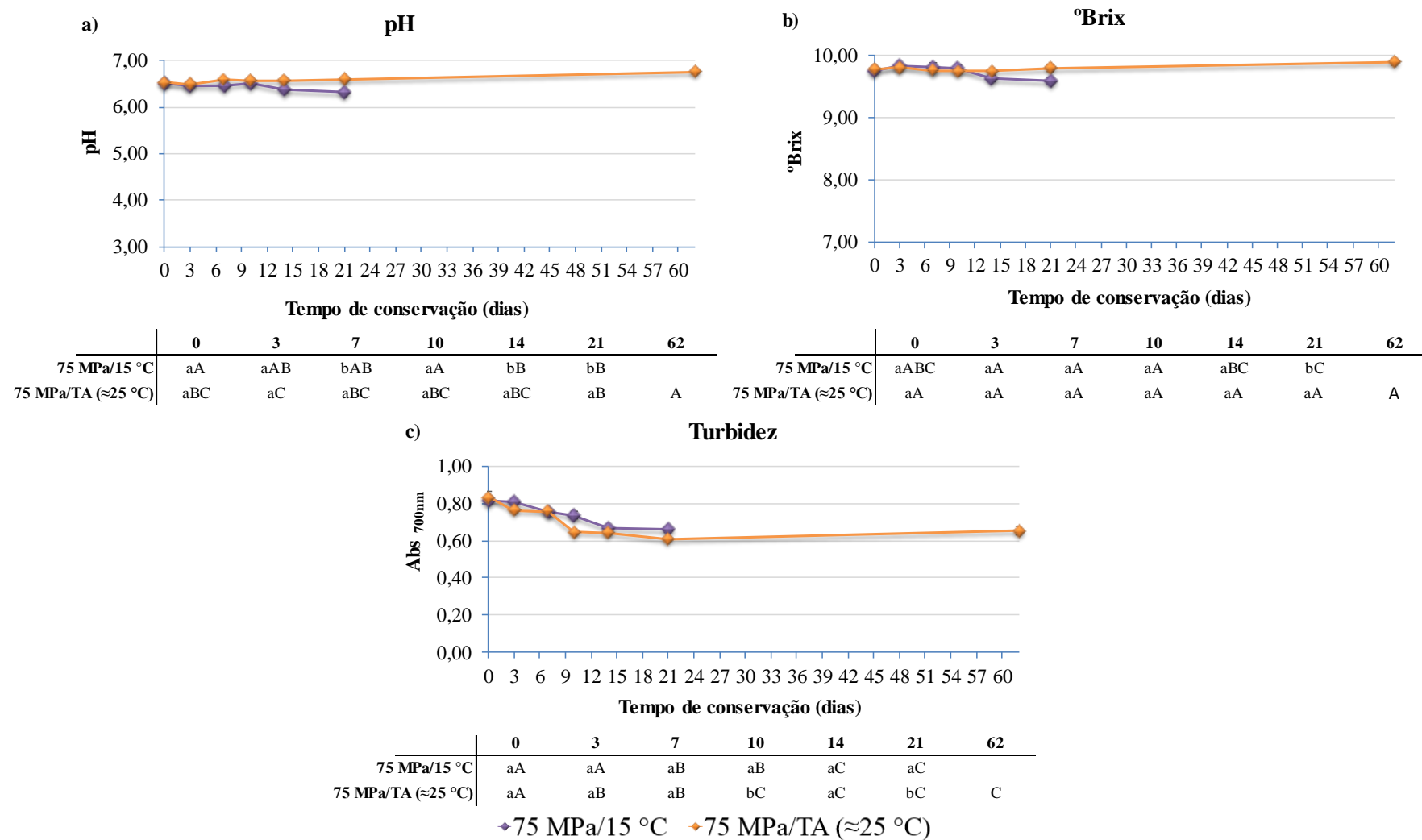


Figura 15 – pH, sólidos solúveis totais (SST) e turbidez para sumo de melancia armazenado sob: AH a 75 MPa/15 °C (21 dias) e sob AH a 75 MPa/TA (≈ 25 °C) (62 dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – C) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b).

Tendo em conta os SST (**Figura 15b**), os valores iniciais variam entre $9,75 \pm 0,02$ e $9,78 \pm 0,02$ °Brix. Com o AH a 75 MPa/15 °C foi verificado uma ligeira diminuição do °Brix ao fim do 14º e 21º dias de armazenamento. Relativamente ao AH a 75 MPa/TA, verificou-se a manutenção do °Brix ao longo dos 62 dias de armazenamento. Quando comparamos as duas condições (75 MPa/15 °C e 75 MPa/TA), verifica-se que apenas ao 21º dia de armazenamento há diferenças significativas ($p < 0,05$). Assim, pode concluir-se que a temperatura de armazenamento utilizando uma pressão de 75 MPa não parece afetar os SST mantendo os valores de °Brix estáveis.

Os valores iniciais de turbidez foram de $0,812 \pm 0,002$ e $0,834 \pm 0,030$ para o AH 75 MPa/15°C e AH 75 MPa/TA, respetivamente (**Figura 15c**). Relativamente ao AH à TA, verificou-se um comportamento semelhante ao AH 75 MPa/15°C com uma diminuição da turbidez ao longo do tempo alcançado um valor mínimo de $0,608 \pm 0,002$ °Brix ao 21º dia à TA, comparativamente com o valor de $0,661 \pm 0,016$ obtido para o mesmo dia de armazenamento a 15 °C. Com estes resultados, é possível verificar que o AH tem efeitos mínimo no pH, nos SST e na turbidez do sumo de melancia a estas duas temperaturas. De novo se verificaram melhores resultados em relação aos valores obtidos quer de °Brix quer de turbidez quando comparados com os valores sob RF (**Figura 13b-c**) com os valores registados sob AH a 75 MPa.

b) Cor

A variação da cor está apresentada na **Figura 16**. Os valores dos parâmetros colorimétricos medidos nestes dois ensaios a 75 MPa e 15 °C e TA, L^* , a^* , b^* , variam entre 35,09 – 35,18, 14,70 – 14,94 e 8,04 – 8,27, respetivamente. Relativamente ao AH a 75 MPa a 15 °C e TA e tendo em conta as análises físico-químicas efetuadas (pH, SST, turbidez e cor), as maiores diferenças foram registadas nos parâmetros colorimétricos. O valor de a^* diminuiu significativamente ($p < 0,05$) durante os 62 dias de armazenamento a 75 MPa/TA a partir do 3º dia como é possível verificar na **Figura 16a**. Relativamente ao AH a 75 MPa/15 °C, também se verificou uma diminuição no valor de a^* mas significativamente menor ($p < 0,05$) do que a diminuição observada a TA. Comparando o 21º dia de AH, a 15 °C verificou-se um valor de a^* de $14,50 \pm 0,00$ enquanto que a TA o valor de a^* foi de $13,19 \pm 0,49$. Assim, verificou-se que a maior temperatura de armazenamento (TA) originou uma maior

diminuição do valor de a^* , ou seja, uma menor tonalidade vermelha no sumo de melancia. Tendo em conta o valor de b^* que representa o tom de amarelo da amostra, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) comparativamente com o valor inicial ao longo dos 62 dias de AH a TA. Relativamente ao AH a 75 MPa/15 °C, o valor inicial manteve-se ao longo dos 21 dias de análise sem qualquer alteração estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Comparando as duas condições, verificou-se que a partir do 10º dia, os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$). O valor de L^* aumentou significativamente ($p < 0,05$) a partir do 7º dia de AH a 75 MPa/TA atingindo um valor de L^* de $38,72 \pm 0,49$ ao fim de 62 dias de AH a TA. A 75 MPa/15 °C, o comportamento verificado foi semelhante pois a luminosidade aumentou com o decorrer do armazenamento. Contudo, ao 21º dia os valores de L^* são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) com valores de $36,67 \pm 0,49$ e $38,67 \pm 0,54$ para o AH a 15 °C e TA, respetivamente.

A diferença total de cor (ΔE^*) (**Figura 16d**) de sumo de melancia armazenado com AH a 75 MPa/TA foi maior ($p < 0,05$) comparativamente com o AH a 75 MPa/15 °C devido principalmente ao aumento observado no valor de L^* e b^* e à diminuição de a^* . No entanto, os dois armazenamentos só apresentaram diferenças significativas entre si a partir do 10º dia de AH. Assim, até ao 10º dia de armazenamento, a cor das amostras manteve-se muito próxima do valor inicial, sendo que, a partir desse dia, o AH a temperatura de 15 °C apresentou menores diferenças totais de cor comparativamente com o AH a TA ($p < 0,05$).

No entanto, relativamente à cor, verificou-se que a 15 °C existiram menos alterações nos parâmetros medidos o que foi confirmado pela obtenção de uma diferença total de cor menor, em relação aos valores iniciais do sumo de melancia. Assim, pode-se concluir que a temperatura tem influência principalmente a nível da cor do sumo. Isto pode dever-se ao facto de à TA as enzimas apresentarem maior atividade o que pode originar a diminuição da turbidez do sumo bem como das alterações colorimétricas observadas. Não obstante a tudo isto, quando comparado com os valores obtidos sob PA/15 °C e RF (**Figura 14d**), o AH a 75 MPa/15 °C apresentou valores de ΔE^* estatisticamente menores ($p < 0,05$), enquanto que os valores de ΔE^* no AH a 75 MPa/TA se assemelham aos obtidos sob RF, sendo inclusivamente melhores do que sob PA/15 °C. Em suma, mesmo à TA, o AH apresenta resultados iguais ou melhores aos obtidos sob RF para todos os parâmetros físico-químicos analisados (pH, SST, turbidez e cor), evidenciando uma clara vantagem em termos de extensão do prazo de validade do sumo de melancia.

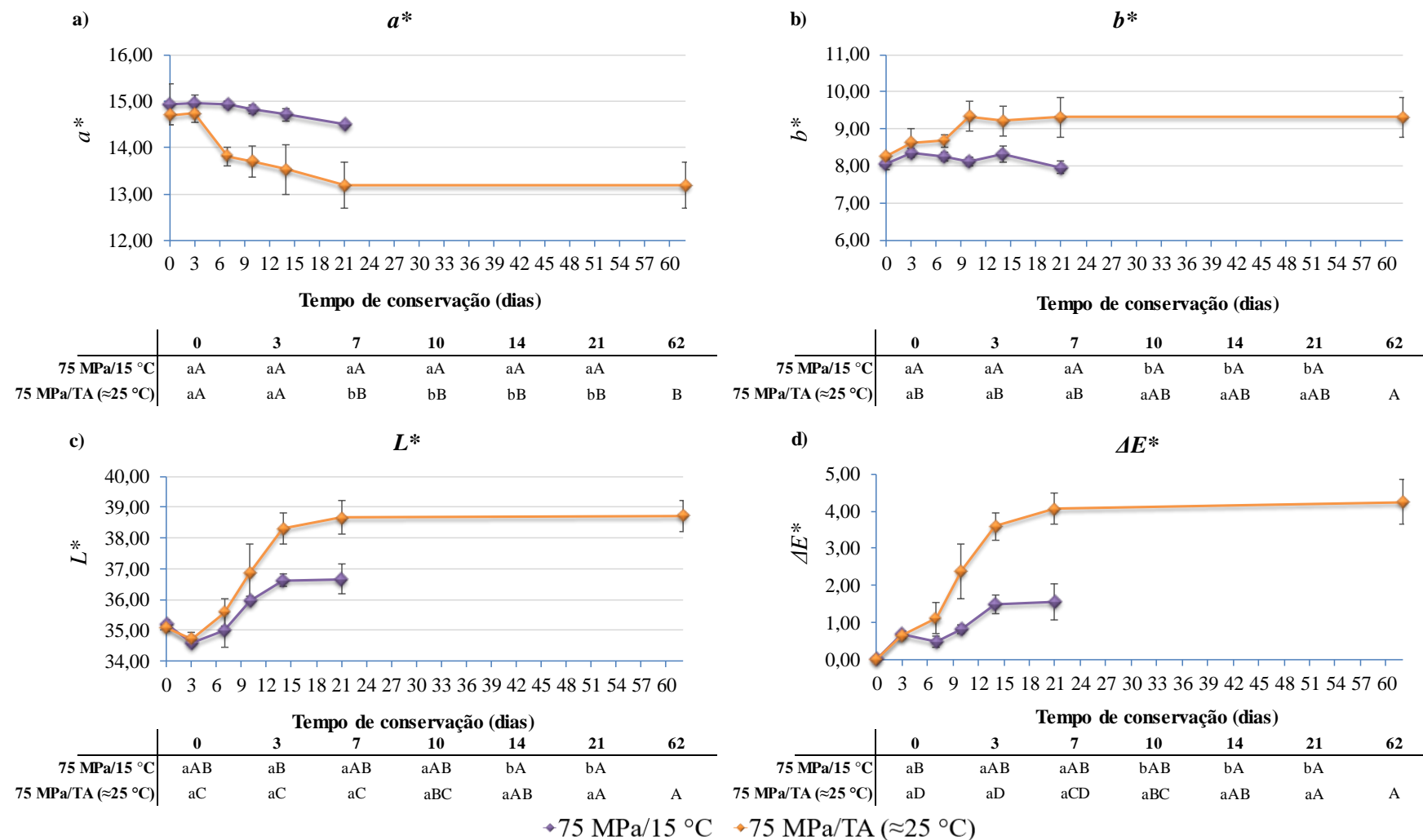


Figura 16 – Parâmetros colorimétricos instrumentais (CIE Lab) e diferença de total de cor (ΔE^*) para sumo de melancia armazenado sob: AH a 75 MPa/15 °C (21 dias) e sob AH a 75 MPa/TA (≈ 25 °C) (62 dias). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dias de AH para cada condição de AH (A – D) e entre condições de AH para cada dia de AH (a – b).

5. Conclusão

O AH a 62,5 e 75 MPa (15 °C) de sumo de melancia foi eficiente não só na inibição do crescimento microbiológico durante 58 e 21 dias, respetivamente, mas também causando uma inativação microbiana quando comparado com os valores de carga microbiana no sumo de melancia antes do armazenamento. Resultados diferentes foram obtidos com AH a 50 MPa à mesma temperatura, com um aumento nas contagens microbianas durante o tempo de armazenamento, alcançando valores acima dos 6 log UFC/mL para MES e PSI ao 7º dia de armazenamento. Contudo, mesmo com AH de 50 MPa/15 °C, o crescimento microbiológico ocorreu a uma taxa menor comparativamente com as amostras RF e PA/15 °C, para os quais, o desenvolvimento microbiano foi mais acentuado.

Relativamente ao efeito combinado da pressão e temperatura foi possível concluir que a temperatura tem influência no crescimento microbiológico à pressão de 50 MPa, sendo que quanto menor for a temperatura, maior é a inibição microbiológica. Neste estudo, verificou-se que um armazenamento a 50 MPa/10 °C, apresentou menor crescimento microbiológico do que 50 MPa/15 °C e 50 MPa/TA, sendo que, à TA o crescimento microbiológico foi mais acentuado. No entanto, quando se aumentou a pressão para 75 MPa não se verificou qualquer efeito da temperatura na inativação microbiológica já que, não foram verificadas diferenças nas contagens microbianas entre 75 MPa/15 °C e 75 MPa/TA. Estes resultados podem indicar que a pressões mais baixas (50 MPa) o crescimento microbiológico é dependente da temperatura, enquanto que a pressões superiores (75 MPa), o crescimento microbiano é independente da temperatura.

Considerando todas as análises físico-químicas efetuadas, o AH a 15 °C apresentou melhores resultados na manutenção dos valores de pH, °Brix e turbidez demonstrando ainda valores dos parâmetros colorimétricos mais próximos dos valores iniciais comparativamente com a RF. Além disso, mesmo o AH à TA, apesar dos valores colorimétricos observados serem semelhantes aos registados sob RF, obteve melhores resultados em relação ao pH, SST e turbidez do sumo de melancia, o que representa uma vantagem em termos de custos energéticos. Resumindo, os resultados obtidos neste estudo, mostram um potencial enorme na conservação de alimentos por AH, sem/com menores custos energéticos (no caso do AH a TA/AH a 15 °C, respetivamente) e com um aumento considerável do tempo de prateleira (pelo menos 62 dias).

6. Perspetivas Futuras

Com os resultados obtidos nesta tese é interessante proceder à realização de estudos complementares para aumentar o conhecimento científico sobre o armazenamento hiperbárico. Neste sentido, a combinação de níveis de pressão e temperatura, superiores e/ou inferiores aos utilizados nesta dissertação, podem ser um ponto de partida fundamental para aprofundar o conhecimento nesta área ainda pouco estudada. No mesmo sentido, o efeito do AH na textura e na degradação de compostos bioativos deve ser analisado noutras matrizes alimentares. Além disso, para perceber se o AH pode ser uma alternativa à RF, estudos sobre o crescimento de patogénicos e de esporos sob diferentes condições de pressão são também requisitos essenciais para perceber a eficiência desta nova metodologia na preservação de alimentos, quer a curto quer a longo prazo. Por outro lado, estudos sobre o efeito do AH nas enzimas responsáveis pela deterioração de alimentos como a PPO, POD e PME por exemplo, são relevantes para conhecer o seu impacto nos produtos alimentares em que estas enzimas estejam ativas, como acontece em produtos não pasteurizados.

7. Referências

- Abadias, M., Alegre, I., Oliveira, M., Altisent, R., & Viñas, I. (2012). Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food Control*, 27(1), 37-44.
- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121-129.
- Aguiló-Aguayo, I., Montero-Calderón, M., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010). Changes on flavor compounds throughout cold storage of watermelon juice processed by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 43-49.
- Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010a). Color and viscosity of watermelon juice treated by high-intensity pulsed electric fields or heat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(2), 299-305.
- Aguiló-Aguayo, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2010b). Impact of high-intensity pulsed electric field variables affecting peroxidase and lipoxigenase activities of watermelon juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 897-902.
- Aoyama, Y., Shigeta, Y., Okazaki, T., Hagura, Y., & Suzuki, K. (2004). Growth inhibition of microorganisms by hydrostatic pressure. *Food Science and Technology Research*, 10(3), 268-272.
- Aoyama, Y., Shigeta, Y., Okazaki, T., Hagura, Y., & Suzuki, K. (2005). Non-thermal inactivation of *bacillus* spores by pressure-holding. *Food Science and Technology Research*, 11(3), 324-327.
- Arocho, Y. D., Bellmer, D., Maness, N., McGlynn, W., & Rayas-Duarte, P. (2012). Watermelon pomace composition and the effect of drying and storage on lycopene content and color. *Journal of Food Quality*, 35(5), 331-340.
- Balasubramaniam, V. M., Martínez-Monteagudo, S. I., & Gupta, R. (2015). Principles and application of high pressure-based technologies in the food industry. *Annual Review of Food Science and Technology*, 6(1), 435-462.
- Beaulieu, J. C., & Lea, J. M. (2006). Characterization and semiquantitative analysis of volatiles in seedless watermelon varieties using solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7789-7793.
- Bermejo-Prada, A. (2014). *Hyperbaric storage of foods at room temperature: characterization in strawberry juice*. Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Madrid.
- Bermejo-Prada, A., López-Caballero, M. E., & Otero, L. (2016). Hyperbaric storage at room temperature: Effect of pressure level and storage time on the natural microbiota of strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 33, 154-161.
- Bermejo-Prada, A., & Otero, L. (2015). Effect of hyperbaric storage at room temperature on color degradation of strawberry juice. *Journal of Food Engineering*, 169, 141-148.
- Bermejo-Prada, A., Segovia-Bravo, K. A., Guignon, B., & Otero, L. (2015). Effect of hyperbaric storage at room temperature on pectin methylesterase activity and serum viscosity of strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 30, 170-176.
- Bermejo-Prada, A., Vega, E., Pérez-Mateos, M., & Otero, L. (2014). Effect of hyperbaric storage at room temperature on the volatile profile of strawberry juice. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 2), 906-914.
- Caminiti, I., Palgan, I., Muñoz, A., Noci, F., Whyte, P., Morgan, D., Cronin, D., & Lyng, J. (2012). The effect of ultraviolet light on microbial inactivation and quality attributes of apple juice. *Food Bioprocess Technology*, 5(2), 680-686.
- Charm, S. E., Longmaid Iii, H. E., & Carver, J. (1977). A simple system for extending refrigerated, nonfrozen preservation of biological material using pressure. *Cryobiology*, 14(5), 625-636.

- Cheftel, J. C., & Culioli, J. (1997). Effects of high pressure on meat: a review. *Meat Science*, 46(3), 211-236.
- Chisari, M., Barbagallo, R. N., Spagna, G., & Artés, F. (2009). Distribution of degradative enzymatic activities in the mesocarp of two melon groups. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(5), 1016-1023.
- Collins, J. K., Wu, G., Perkins-Veazie, P., Spears, K., Claypool, P. L., Baker, R. A., & Clevidence, B. A. (2007). Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. *Nutrition*, 23(3), 261-266.
- Deuchi T., & R, H. (1992). High pressure treatments at subzero temperature: application to preservation, rapid freezing and rapid thawing of foods. In H. R. Balny C, Heremans K, Masson P (Ed.), *High Pressure and Biotechnology*, vol. 224 (pp. 353-355). Montrouge, France: Colloque IN-SERM/John Libbey Eurotext Ltd.
- Duarte, R. V., Moreira, S. A., Fernandes, P. A. R., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Queiros, R. P., Santos, D. I., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2015). Preservation under pressure (hyperbaric storage) at 25 degrees C, 30 degrees C and 37 degrees C of a highly perishable dairy food and comparison with refrigeration. *CyTA-Journal of Food*, 13(3), 321-328.
- Farkas, D. F., & Hoover, D. G. (2000). High Pressure Processing. *Journal of Food Science*, 65, 47-64.
- FDA. (2009). Draft guidance for industry: guide to minimize microbial food safety hazards of melons. In): Food and Drug Administration
- Feng, M., Ghafoor, K., Seo, B., Yang, K., & Park, J. (2013). Effects of ultraviolet-C treatment in Teflon®-coil on microbial populations and physico-chemical characteristics of watermelon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 133-139.
- Fernandes, P. A. R., Moreira, S. A., Duarte, R., Santos, D. I., Queirós, R. P., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2015). Preservation of sliced cooked ham at 25, 30 and 37 °C under moderated pressure (hyperbaric storage) and comparison with refrigerated storage. *Food and Bioprocess Processing*, 95, 200-207.
- Fernandes, P. A. R., Moreira, S. A., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Queiros, R. P., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2015). Food preservation under pressure (hyperbaric storage) as a possible improvement/alternative to refrigeration. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 1-10.
- Fidalgo, L., Santos, M., Queirós, R., Inácio, R., Mota, M., Lopes, R., Gonçalves, M., Neto, R., & Saraiva, J. (2014). Hyperbaric storage at and above room temperature of a highly perishable food. *Food Bioprocess Technology*, 7(7), 2028-2037.
- Figuroa, A., Sanchez-Gonzalez, M. A., Perkins-Veazie, P. M., & Arjmandi, B. H. (2011). Effects of watermelon supplementation on aortic blood pressure and wave reflection in individuals with prehypertension: a pilot study. *American Journal of Hypertension*, 24(1), 40-44.
- Guiavarch, Y., Segovia, O., Hendrickx, M., & Van Loey, A. (2005). Purification, characterization, thermal and high-pressure inactivation of a pectin methylesterase from white grapefruit (*Citrus paradisi*). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6(4), 363-371.
- Heinz, V., & Buckow, R. (2010). Food preservation by high pressure. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(1), 73-81.
- Hendrickx, M., Ludikhuyze, L., Van den Broeck, I., & Weemaes, C. (1998). Effects of high pressure on enzymes related to food quality. *Trends in Food Science & Technology*, 9(5), 197-203.
- Huang, H.-W., Lung, H.-M., Yang, B. B., & Wang, C.-Y. (2014). Responses of microorganisms to high hydrostatic pressure processing. *Food Control*, 40, 250-259.
- Huor, S. S., Ahmed, E. M., Rao, P. V., & Cornell, J. A. (1980). Formulation and sensory evaluation of a fruit punch containing watermelon juice. *Journal of Food Science*, 45(4), 809-813.
- Husson, A., Brasse-Lagnel, C., Fairand, A., Renouf, S., & Lavoigne, A. (2003). Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *European Journal of Biochemistry*, 270(9), 1887-1899.
- INSA. (2015). Detalhe do Alimento - Melancia. In): Instituto Nacional Saúde Dr. Ricardo Jorge.

- James, S. J., & James, C. (2010). The food cold-chain and climate change. *Food Research International*, 43(7), 1944-1956.
- Jannasch, H. W., Eimhjellen, K., Wirsén, C., & Farmanfarmaian, A. (1971). Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science*, 171(3972), 672-675.
- Kalichevsky, M., Knorr, D., & Lillford, P. (1995). Potential food applications of high-pressure effects on ice-water transitions. *Trends in Food Science & Technology*, 6(8), 253-259.
- Knorr, D., Froehling, A., Jaeger, H., Reineke, K., Schlueter, O., & Schoessler, K. (2011). Emerging technologies in food processing. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2, 203-235.
- Ko, W.-C., & Hsu, K.-C. (2001). Changes in k value and microorganisms of tilapia fillet during storage at high-pressure, normal temperature. *Journal of Food Protection*, 64(1), 94-98.
- Laboissière, L., Deliza, R., Barros-Marcellini, A., Rosenthal, A., Camargo, L., & Junqueira, R. (2007). Effects of high hydrostatic pressure (HHP) on sensory characteristics of yellow passion fruit juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(4), 469-477.
- Liu, Y., Hu, X., Zhao, X., & Song, H. (2012). Combined effect of high pressure carbon dioxide and mild heat treatment on overall quality parameters of watermelon juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 112-119.
- Liu, Y., Zhao, X. Y., Zou, L., & Hu, X. S. (2013). Effect of high hydrostatic pressure on overall quality parameters of watermelon juice. *Food Science and Technology International*, 19(3), 197-207.
- Moreira, S. A., Fernandes, P. A. R., Duarte, R., Santos, D. I., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Queirós, R. P., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2015). A first study comparing preservation of a ready-to-eat soup under pressure (hyperbaric storage) at 25°C and 30°C with refrigeration. *Food Science & Nutrition*, 3(6), 467-474.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2007). Influence of treatment time and pulse frequency on *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 192-200.
- Mosqueda-Melgar, J., Raybaudi-Massilia, R. M., & Martín-Belloso, O. (2008). Combination of high-intensity pulsed electric fields with natural antimicrobials to inactivate pathogenic microorganisms and extend the shelf-life of melon and watermelon juices. *Food Microbiology*, 25(3), 479-491.
- Mota, M. J., Lopes, R. P., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2013). Microorganisms under high pressure - adaptation, growth and biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1426-1434.
- Mújica-Paz, H., Valdez-Fragoso, A., Samson, C. T., Welti-Chanes, J., & Torres, J. A. (2011). High-pressure processing technologies for the pasteurization and sterilization of foods. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 969-985.
- Oberoi, D. P. S., & Sogi, D. S. (2015). Effect of drying methods and maltodextrin concentration on pigment content of watermelon juice powder. *Journal of Food Engineering*, 165, 172-178.
- Oey, I., Lille, M., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2008). Effect of high-pressure processing on colour, texture and flavour of fruit- and vegetable-based food products: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19(6), 320-328.
- Oms-Oliu, G., Odriozola-Serrano, I., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2009). Effects of high-intensity pulsed electric field processing conditions on lycopene, vitamin C and antioxidant capacity of watermelon juice. *Food Chemistry*, 115(4), 1312-1319.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2009). Effect of high pressure homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 26-31.
- Penteado, A. L., & Leitão, M. F. F. (2004a). Growth of *Listeria monocytogenes* in melon, watermelon and papaya pulps. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 89-94.
- Penteado, A. L., & Leitão, M. F. F. (2004b). Growth of *Salmonella Enteritidis* in melon, watermelon and papaya pulp stored at different times and temperatures. *Food Control*, 15(5), 369-373.

- Pérez, A. G., Sanz, C., Olías, R., & Olías, J. M. (1999). Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 249-253.
- Perkins-Veazie, P., Collins, J. K., Davis, A. R., & Roberts, W. (2006). Carotenoid content of 50 watermelon cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2593-2597.
- Pinto, C., Moreira, S. A., Fidalgo, L. G., Santos, M. D., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2016). Shelf-life extension of watermelon juice preserved by hyperbaric storage at room temperature compared to refrigeration. *LWT - Food Science and Technology*, 72, 78-80.
- Poduri, A., Rateri, D. L., Saha, S. K., Saha, S., & Daugherty, A. (2013). *Citrullus lanatus* 'sentinel' (watermelon) extract reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(5), 882-886.
- Qiu, W., Jiang, H., Wang, H., & Gao, Y. (2006). Effect of high hydrostatic pressure on lycopene stability. *Food Chemistry*, 97(3), 516-523.
- Queiros, R. P., Rainho, D., Santos, M. D., Fidalgo, L. G., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2014). High pressure and thermal pasteurization effects on sweet cherry juice microbiological stability and physicochemical properties. *High Pressure Research*, 35(1), 69-77.
- Queirós, R. P., Santos, M. D., Fidalgo, L. G., Mota, M. J., Lopes, R. P., Inácio, R. S., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2014). Hyperbaric storage of melon juice at and above room temperature and comparison with storage at atmospheric pressure and refrigeration. *Food Chemistry*, 147, 209-214.
- Rastogi, N., Raghavarao, K., Balasubramaniam, V., Niranjana, K., & Knorr, D. (2007). Opportunities and challenges in high pressure processing of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(1), 69-112.
- Reddy, N. R., Solomon, H. M., Tetzloff, R. C., & Rhodehamel, E. J. (2003). Inactivation of *Clostridium botulinum* type A spores by high-pressure processing at elevated temperatures. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1402-1407.
- Rimando, A. M., & Perkins-Veazie, P. M. (2005). Determination of citrulline in watermelon rind. *Journal of Chromatography A*, 1078(1-2), 196-200.
- Ritz, M., Freulet, M., Orange, N., & Federighi, M. (2000). Effects of high hydrostatic pressure on membrane proteins of *Salmonella typhimurium*. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 115-119.
- Santos, M. D., Queirós, R. P., Fidalgo, L. G., Inácio, R. S., Lopes, R. P., Mota, M. J., Sousa, S. G., Delgadillo, I., & Saraiva, J. A. (2014). Preservation of a highly perishable food, watermelon juice, at and above room temperature under mild pressure (hyperbaric storage) as an alternative to refrigeration. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1, Part 2), 901-905.
- Segovia-Bravo, K. A., Guignon, B., Bermejo-Prada, A., Sanz, P. D., & Otero, L. (2012). Hyperbaric storage at room temperature for food preservation: a study in strawberry juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15, 14-22.
- Sharma, M., Adler, B. B., Harrison, M. D., & Beuchat, L. R. (2005). Thermal tolerance of acid-adapted and unadapted *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in cantaloupe juice and watermelon juice. *Letters in Applied Microbiology*, 41(6), 448-453.
- Smelt, J. P. P. M. (1998). Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *Trends in Food Science & Technology*, 9(4), 152-158.
- Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. (2016). *Bacillus* spores in the food industry: A review on resistance and response to novel inactivation technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(6), 1139-1148.
- Soteriou, G. A., Kyriacou, M. C., Siomos, A. S., & Gerasopoulos, D. (2014). Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting. *Food Chemistry*, 165, 282-289.
- Soumya, V., & Ramana Rao, T. (2014). Nutritional quality evaluation of four icebox cultivars of watermelon fruit during their development and ripening. *International Food Research Journal*, 21(2), 631-639.

- Tarazona-Díaz, M. P., Alacid, F., Carrasco, M., Martínez, I., & Aguayo, E. (2013). Watermelon juice: potential functional drink for sore muscle relief in athletes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(31), 7522-7528.
- Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Ilahy, R., Jebari, H., & Dalessandro, G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(7), 923-928.
- Tlili, I., Hdider, C., Lenucci, M. S., Riadh, I., Jebari, H., & Dalessandro, G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activities of different watermelon (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansfeld) cultivars as affected by fruit sampling area. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(3), 307-314.
- Tournas, V. H., Heeres, J., & Burgess, L. (2006). Moulds and yeasts in fruit salads and fruit juices. *Food Microbiology*, 23(7), 684-688.
- USDA. (2015). Tabela nutricional melancia crua. In: United States Department of Agriculture.
- Walsh, K. A., Bennett, S. D., Mahovic, M., & Gould, L. H. (2014). Outbreaks associated with cantaloupe, watermelon, and honeydew in the United States, 1973-2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(12), 945-952.
- Wang, H.-y., Hu, X.-s., Chen, F., Wu, J.-h., Zhang, Z.-h., Liao, X.-j., & Wang, Z.-f. (2006). Kinetic analysis of non-enzymatic browning in carrot juice concentrate during storage. *European Food Research and Technology*, 223(2), 282-289.
- Zhang, C., Trierweiler, B., Li, W., Butz, P., Xu, Y., Rüfer, C. E., Ma, Y., & Zhao, X. (2011). Comparison of thermal, ultraviolet-c, and high pressure treatments on quality parameters of watermelon juice. *Food Chemistry*, 126(1), 254-260.
- Ziane, M., Desriac, N., Le Chevalier, P., Couvert, O., Moussa-Boudjemaa, B., & Leguerinel, I. (2014). Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control*, 45, 16-21.

8. Anexos

Índice de Anexos

A. Equipamentos de Alta Pressão Utilizados	77
B. Preparação dos Meios para Microbiologia.....	78
C. Resultados de Microbiologia com AH a 15 °C	79
D. Resultados de Microbiologia do APH	81
E. Resultados de Microbiologia com AH a 50 MPa.....	82
F. Resultados de Microbiologia com AH a 75 MPa.....	84
G. Resultados de Microbiologia à TA	86
H. Resultados de Físico-Química no AH a 15 °C	87
I. Resultados de Físico-Química no AH a 75 MPa	89

Índice de Figuras em Anexo

Figura I – (a) – Equipamento de AP Unipress U33 onde foram realizados os ensaios a 10 e 15 °C; (b) – Equipamento de multivasos de AP Stanstead SFP FPG13900 onde foram realizados os ensaios à temperatura ambiente (≈ 25 °C).....	77
--	----

Índice de Tabelas em Anexo

Tabela I – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.	79
Tabela II – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.	79
Tabela III – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.	79
Tabela IV – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.	80
Tabela V – Contagens microbianas (expressas em log UFC/mL) de armazenamento Pós-Hiperbárico de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) à pressão atmosférica (0,1 MPa).	81
Tabela VI – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.	82
Tabela VII – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.	82
Tabela VIII – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.	82
Tabela IX – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.	83
Tabela X – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.	84
Tabela XI – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.	84
Tabela XII – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.	84
Tabela XIII – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.	85
Tabela XIV – Contagens microbianas (expressas em log UFC/mL) do AH a 100 MPa/TA ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) para mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), <i>Enterobacteriaceae</i> (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração ($\approx 4^{\circ}\text{C}$) à pressão atmosférica (0,1 MPa) durante 55 dias de armazenamento.	86
Tabela XV – Contagens microbianas (expressas em Log N) do AH a 75 MPa/TA ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) de bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE) durante 55 dias de armazenamento.	86
Tabela XVI – pH de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15°C	87

Tabela XVII – Sólidos solúveis totais (°Brix) de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	87
Tabela XVIII – Turbidez de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	87
Tabela XIX – Valor de L^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	87
Tabela XX – Valor de a^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	88
Tabela XXI – Valor de b^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	88
Tabela XXII – Valor de ΔE^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.	88
Tabela XXIII – pH de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	89
Tabela XXIV – Sólidos solúveis totais (°Brix) de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	89
Tabela XXV – Turbidez de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	89
Tabela XXVI – Valor de L^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	90
Tabela XXVII – Valor de a^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	90
Tabela XXVIII – Valor de b^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	90
Tabela XXIX – Valor de ΔE^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.	91

A. Equipamentos de Alta Pressão Utilizados



Figura I – (a) – Equipamento de AP Unipress U33 onde foram realizados os ensaios a 10 e 15 °C; (b) – Equipamento de multivastos de AP Stanstead SFP FPG13900 onde foram realizados os ensaios à temperatura ambiente (≈ 25 °C).

B. Preparação dos Meios para Microbiologia

A preparação do ringer é efetuada adicionando 1 pastilha de ringer a 500 mL de água destilada que posteriormente é autoclavado durante 15 minutos a 121°C.

A preparação de PCA e RBCA implica adição a um litro de água, de 22,5 g e 32,2 g de cada meio, respetivamente, sendo depois autoclavados a 121 °C durante 15 minutos e no fim, colocados num banho de água a, aproximadamente 50 °C até serem vertidos para as placas.

Para a preparação de VRBDA, inicialmente, a água é autoclavada a 121 °C durante 15 minutos sem adição do meio. Depois é adicionada 39,5 g de VRBDA num litro de água destilada e é fervido num micro-ondas antes de ser colocado num banho a 50°C para ser utilizado nos testes microbiológicos.

C. Resultados de Microbiologia com AH a 15 °C

Tabela I – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	4,84 ± 0,07	4,84 ± 0,07	4,84 ± 0,07	4,44 ± 0,03	4,38 ± 0,01
3	5,75 ± 0,18	≥ 6,48	5,27 ± 0,17	3,74 ± 0,06	4,85 ± 0,16
7	≥ 6,48	≥ 6,48	≥ 6,48	3,08 ± 0,04	3,98 ± 0,03
10	-	-	-	2,97 ± 0,07	3,66 ± 0,05
14	-	-	-	2,55 ± 0,11	3,20 ± 0,03
21	-	-	-	2,43 ± 0,14	2,81 ± 0,03
37	-	-	-	-	2,52 ± 0,15
58	-	-	-	-	2,30 ± 0,10

Tabela II – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	3,62 ± 0,21	3,62 ± 0,21	3,62 ± 0,21	3,52 ± 0,15	3,70 ± 0,09
3	4,89 ± 0,19	5,67 ± 0,16	4,41 ± 0,07	2,88 ± 0,03	2,89 ± 0,25
7	6,25 ± 0,16	≥ 6,48	5,71 ± 0,20	≤ 1,00	3,38 ± 0,08
10	-	-	-	≤ 1,00	2,45 ± 0,22
14	-	-	-	≤ 1,00	≤ 1,00
21	-	-	-	≤ 1,00	≤ 1,00
37	-	-	-	-	≤ 1,00
58	-	-	-	-	≤ 1,00

Tabela III – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	3,81 ± 0,46	3,81 ± 0,46	3,81 ± 0,46	3,34 ± 0,10	3,65 ± 0,17
3	4,38 ± 0,20	5,62 ± 0,26	3,45 ± 0,23	2,27 ± 0,17	3,02 ± 0,01
7	6,45 ± 0,30	≥ 6,70	5,97 ± 0,15	1,99 ± 0,09	3,47 ± 0,12
10	-	-	-	1,86 ± 0,15	3,30 ± 0,15
14	-	-	-	≤ 1,00	2,07 ± 0,04
21	-	-	-	≤ 1,00	1,86 ± 0,28
37	-	-	-	-	1,94 ± 0,24
58	-	-	-	-	≤ 1,00

Tabela IV – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de pressão e temperatura.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	4,87 ± 0,12	4,87 ± 0,12	4,87 ± 0,12	4,45 ± 0,03	4,25 ± 0,14
3	5,67 ± 0,05	≥ 6,48	5,29 ± 0,21	3,52 ± 0,05	4,72 ± 0,04
7	≥ 6,48	≥ 6,48	≥ 6,48	3,07 ± 0,02	4,12 ± 0,01
10	-	-	-	2,87 ± 0,04	3,62 ± 0,04
14	-	-	-	2,42 ± 0,04	3,15 ± 0,01
21	-	-	-	2,45 ± 0,08	2,81 ± 0,05
37	-	-	-	-	2,56 ± 0,07
58	-	-	-	-	2,32 ± 0,14

D. Resultados de Microbiologia do APH

Tabela V – Contagens microbianas (expressas em log UFC/mL) de armazenamento Pós-Hiperbárico de mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração ($\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) à pressão atmosférica (0,1 MPa).

Dia	MES	ENT	BL	PSI
0	$2,52 \pm 0,15$	$\leq 1,00$	$1,94 \pm 0,24$	$2,56 \pm 0,07$
2	$2,48 \pm 0,19$	$\leq 1,00$	$1,86 \pm 0,15$	$2,40 \pm 0,16$
7	$5,19 \pm 0,12$	$\leq 1,00$	$4,35 \pm 0,05$	$5,18 \pm 0,11$

E. Resultados de Microbiologia com AH a 50 MPa

Tabela VI – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.

Dia	50 MPa/10 °C	50 MPa/15 °C	50 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	4,06 ± 0,02	4,84 ± 0,07	4,07 ± 0,04
3	3,89 ± 0,08	5,27 ± 0,17	≥ 6,48
7	4,13 ± 0,09	≥ 6,48	≥ 6,48
10	5,00 ± 0,20	-	-
14	6,10 ± 0,22	-	-
21	6,07 ± 0,13	-	-

Tabela VII – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.

Dia	50 MPa/10 °C	50 MPa/15 °C	50 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	3,64 ± 0,03	3,62 ± 0,21	3,74 ± 0,03
3	3,25 ± 0,03	4,41 ± 0,07	5,93 ± 0,28
7	3,25 ± 0,18	5,71 ± 0,20	≥ 6,48
10	4,17 ± 0,14	-	-
14	4,75 ± 0,11	-	-
21	5,80 ± 0,16	-	-

Tabela VIII – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.

Dia	50 MPa/10 °C	50 MPa/15 °C	50 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	3,44 ± 0,04	3,81 ± 0,46	3,41 ± 0,12
3	3,26 ± 0,16	3,45 ± 0,23	4,24 ± 0,18
7	4,19 ± 0,31	5,97 ± 0,15	≥ 6,48
10	4,96 ± 0,26	-	-
14	6,04 ± 0,16	-	-
21	6,32 ± 0,15	-	-

Tabela IX – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 50 MPa.

Dia	50 MPa/10 °C	50 MPa/15 °C	50 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	4,11 \pm 0,03	4,87 \pm 0,12	4,04 \pm 0,03
3	3,94 \pm 0,03	5,29 \pm 0,21	$\geq 6,48$
7	4,17 \pm 0,09	$\geq 6,48$	$\geq 6,48$
10	5,03 \pm 0,20	-	-
14	6,09 \pm 0,17	-	-
21	6,01 \pm 0,16	-	-

F. Resultados de Microbiologia com AH a 75 MPa

Tabela X – Contagens de MES (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	4,44 \pm 0,03	4,02 \pm 0,04
3	3,74 \pm 0,06	3,13 \pm 0,02
7	3,08 \pm 0,04	2,51 \pm 0,02
10	2,97 \pm 0,07	2,44 \pm 0,05
14	2,55 \pm 0,11	2,20 \pm 0,02
21	2,43 \pm 0,14	2,15 \pm 0,03
62	-	$\leq 1,00$

Tabela XI – Contagens de ENT (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	3,52 \pm 0,15	3,73 \pm 0,04
3	2,88 \pm 0,03	2,99 \pm 0,03
7	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
10	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
14	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
21	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
62	-	$\leq 1,00$

Tabela XII – Contagens de BL (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	3,44 \pm 0,10	3,54 \pm 0,03
3	2,27 \pm 0,17	2,57 \pm 0,12
7	1,99 \pm 0,09	2,44 \pm 0,17
10	1,86 \pm 0,15	1,93 \pm 0,06
14	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
21	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
62	-	$\leq 1,00$

Tabela XIII – Contagens de PSI (expressas em log UFC/mL) de sumo de melancia armazenado sobre diferentes condições de temperatura a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	4,45 \pm 0,03	4,01 \pm 0,03
3	3,52 \pm 0,05	3,16 \pm 0,04
7	3,07 \pm 0,02	2,42 \pm 0,02
10	2,87 \pm 0,04	2,38 \pm 0,05
14	2,42 \pm 0,04	2,19 \pm 0,00
21	2,45 \pm 0,08	2,16 \pm 0,04
62	-	$\leq 1,00$

G. Resultados de Microbiologia à TA

Tabela XIV – Contagens microbianas (expressas em log UFC/mL) do AH a 100 MPa/TA ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) para mesófilos aeróbios totais (MES) e psicrófilos (PSI), *Enterobacteriaceae* (ENT) e bolores e leveduras (BL) durante 7 dias de armazenamento sob refrigeração ($\approx 4\text{ }^{\circ}\text{C}$) à pressão atmosférica (0,1 MPa) durante 55 dias de armazenamento.

Dia	MES	ENT	BL	PSI
0	$8,31 \pm 0,05$	$3,00 \pm 0,00$	$6,46 \pm 0,11$	$8,28 \pm 0,05$
3	$3,72 \pm 0,03$	$\leq 1,00$	$1,99 \pm 0,00$	$3,68 \pm 0,05$
7	$2,00 \pm 0,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$2,00 \pm 0,00$
10	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
14	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
21	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$
55	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$	$\leq 1,00$

Tabela XV – Contagens microbianas (expressas em Log N) do AH a 75 MPa/TA ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) de bactérias mesofílicas formadoras de esporos (BMFE) durante 55 dias de armazenamento.

Dia	75 MPa/TA ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)
0	$3,22 \pm 0,10$
3	$\leq 1,00$
7	$\leq 1,00$
10	$\leq 1,00$
14	$\leq 1,00$
21	$\leq 1,00$
55	$\leq 1,00$

H. Resultados de Físico-Química no AH a 15 °C

Tabela XVI – pH de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	6,50 ± 0,02	6,50 ± 0,02	6,57 ± 0,01	6,50 ± 0,02	6,50 ± 0,02
3	6,42 ± 0,10	4,16 ± 0,04	6,36 ± 0,02	6,47 ± 0,01	6,47 ± 0,03
7	6,37 ± 0,02	3,75 ± 0,05	6,29 ± 0,02	6,45 ± 0,01	6,52 ± 0,04
10	6,24 ± 0,00	3,68 ± 0,08	-	6,52 ± 0,00	6,43 ± 0,03
14	4,79 ± 0,01	3,56 ± 0,01	-	6,38 ± 0,03	6,45 ± 0,01
21	4,18 ± 0,03	3,50 ± 0,09	-	6,33 ± 0,00	6,55 ± 0,03

Tabela XVII – Sólidos solúveis totais (°Brix) de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	9,75 ± 0,02	9,75 ± 0,02	9,78 ± 0,02	9,75 ± 0,02	9,80 ± 0,05
3	9,83 ± 0,05	9,28 ± 0,07	9,80 ± 0,05	9,83 ± 0,00	9,78 ± 0,02
7	9,80 ± 0,05	8,85 ± 0,07	9,80 ± 0,05	9,82 ± 0,07	9,78 ± 0,02
10	9,83 ± 0,00	8,83 ± 0,05	-	9,80 ± 0,05	9,72 ± 0,02
14	9,43 ± 0,05	8,78 ± 0,02	-	9,63 ± 0,05	9,67 ± 0,09
21	9,20 ± 0,05	8,50 ± 0,09	-	9,60 ± 0,05	9,62 ± 0,02

Tabela XVIII – Turbidez de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	0,812 ± 0,002	0,812 ± 0,002	0,851 ± 0,023	0,812 ± 0,002	0,842 ± 0,010
3	0,795 ± 0,035	1,232 ± 0,105	0,790 ± 0,001	0,807 ± 0,000	0,773 ± 0,017
7	0,742 ± 0,006	1,248 ± 0,012	0,684 ± 0,013	0,752 ± 0,002	0,769 ± 0,009
10	0,777 ± 0,024	1,255 ± 0,043	-	0,737 ± 0,018	0,725 ± 0,020
14	1,059 ± 0,019	1,247 ± 0,002	-	0,670 ± 0,010	0,702 ± 0,003
21	1,165 ± 0,032	1,254 ± 0,001	-	0,661 ± 0,016	0,671 ± 0,007

Tabela XIX – Valor de L^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	35,18 ± 0,15	35,18 ± 0,15	35,63 ± 0,38	35,18 ± 0,15	35,36 ± 0,42
3	34,65 ± 0,35	34,89 ± 0,02	34,99 ± 0,46	34,58 ± 0,02	34,94 ± 0,15
7	34,64 ± 0,40	34,55 ± 0,01	35,71 ± 0,31	35,00 ± 0,53	34,90 ± 0,25
10	35,12 ± 0,10	34,51 ± 0,05	-	35,99 ± 0,13	35,40 ± 0,13
14	34,64 ± 0,02	34,95 ± 0,44	-	36,63 ± 0,20	35,05 ± 0,60
21	34,46 ± 0,03	33,60 ± 0,04	-	36,67 ± 0,49	36,33 ± 0,23

Tabela XX – Valor de a^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	14,94 ± 0,44	14,94 ± 0,44	14,74 ± 0,25	14,94 ± 0,44	15,33 ± 0,10
3	14,97 ± 0,01	12,99 ± 0,00	14,59 ± 0,07	14,95 ± 0,17	14,89 ± 0,29
7	15,10 ± 0,07	12,23 ± 0,17	14,84 ± 0,10	14,93 ± 0,06	14,51 ± 0,24
10	14,48 ± 0,33	12,14 ± 0,01	-	14,84 ± 0,09	14,87 ± 0,25
14	12,80 ± 0,29	12,28 ± 0,14	-	14,71 ± 0,13	14,26 ± 0,22
21	12,51 ± 0,03	12,20 ± 0,04	-	14,50 ± 0,00	13,21 ± 0,36

Tabela XXI – Valor de b^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	8,04 ± 0,13	8,04 ± 0,13	8,83 ± 0,22	8,04 ± 0,13	8,54 ± 0,02
3	8,45 ± 0,08	7,46 ± 0,02	8,32 ± 0,51	8,36 ± 0,12	8,24 ± 0,23
7	8,27 ± 0,41	7,22 ± 0,04	8,43 ± 0,27	8,27 ± 0,12	8,34 ± 0,01
10	7,27 ± 0,21	7,23 ± 0,05	-	8,12 ± 0,11	8,12 ± 0,07
14	7,27 ± 0,14	6,56 ± 0,26	-	8,33 ± 0,22	7,95 ± 0,26
21	6,62 ± 0,06	6,41 ± 0,11	-	7,96 ± 0,17	6,98 ± 0,14

Tabela XXII – Valor de ΔE^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes condições de pressão a 15 °C.

Dia	RF/4 °C	PA/15 °C	50 MPa/15 °C	75 MPa/15 °C	62,5 MPa/15 °C
0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
3	0,70 ± 0,22	2,06 ± 0,01	0,68 ± 0,22	0,70 ± 0,08	0,72 ± 0,18
7	0,72 ± 0,19	2,90 ± 0,17	0,48 ± 0,25	0,47 ± 0,15	0,99 ± 0,09
10	0,91 ± 0,35	3,00 ± 0,01	-	0,82 ± 0,13	0,63 ± 0,24
14	2,34 ± 0,31	3,08 ± 0,03	-	1,50 ± 0,25	1,32 ± 0,43
21	2,91 ± 0,05	3,56 ± 0,02	-	1,56 ± 0,48	2,82 ± 0,27

I. Resultados de Físico-Química no AH a 75 MPa

Tabela XXIII – pH de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	6,50 \pm 0,02	6,54 \pm 0,03
3	6,47 \pm 0,01	6,49 \pm 0,00
7	6,45 \pm 0,01	6,58 \pm 0,02
10	6,52 \pm 0,00	6,58 \pm 0,02
14	6,38 \pm 0,03	6,58 \pm 0,03
21	6,33 \pm 0,00	6,60 \pm 0,01
62	-	6,76 \pm 0,06

Tabela XXIV – Sólidos solúveis totais (°Brix) de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	9,75 \pm 0,02	9,78 \pm 0,02
3	9,83 \pm 0,00	9,82 \pm 0,02
7	9,82 \pm 0,0	9,77 \pm 0,05
10	9,80 \pm 0,05	9,75 \pm 0,02
14	9,63 \pm 0,05	9,75 \pm 0,02
21	9,60 \pm 0,05	9,80 \pm 0,05
62	-	9,90 \pm 0,05

Tabela XXV – Turbidez de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	0,812 \pm 0,002	0,834 \pm 0,030
3	0,807 \pm 0,000	0,764 \pm 0,007
7	0,751 \pm 0,002	0,758 \pm 0,000
10	0,737 \pm 0,018	0,645 \pm 0,006
14	0,670 \pm 0,010	0,643 \pm 0,004
21	0,661 \pm 0,016	0,608 \pm 0,002
62	-	0,653 \pm 0,022

Tabela XXVI – Valor de L^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	35,18 \pm 0,15	35,09 \pm 0,13
3	34,58 \pm 0,02	34,73 \pm 0,19
7	35,00 \pm 0,53	35,58 \pm 0,45
10	35,99 \pm 0,13	36,89 \pm 0,93
14	36,63 \pm 0,20	38,31 \pm 0,50
21	36,67 \pm 0,49	38,67 \pm 0,54
62	-	38,72 \pm 0,49

Tabela XXVII – Valor de a^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	14,94 \pm 0,44	14,70 \pm 0,21
3	14,95 \pm 0,17	14,74 \pm 0,21
7	14,93 \pm 0,06	13,82 \pm 0,20
10	14,84 \pm 0,09	13,71 \pm 0,33
14	14,71 \pm 0,13	13,54 \pm 0,54
21	14,50 \pm 0,00	13,19 \pm 0,49
62	-	13,35 \pm 0,49

Tabela XXVIII – Valor de b^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	8,04 \pm 0,13	8,27 \pm 0,07
3	8,36 \pm 0,12	8,64 \pm 0,36
7	8,27 \pm 0,12	8,68 \pm 0,16
10	8,12 \pm 0,11	9,34 \pm 0,39
14	8,33 \pm 0,22	9,21 \pm 0,40
21	7,96 \pm 0,17	9,32 \pm 0,53
62	-	10,02 \pm 0,31

Tabela XXIX – Valor de ΔE^* de sumo de melancia armazenado sob diferentes temperaturas a 75 MPa.

Dia	75 MPa/15 °C	75 MPa/TA (≈ 25 °C)
0	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
3	0,70 \pm 0,08	0,64 \pm 0,07
7	0,47 \pm 0,15	1,11 \pm 0,41
10	0,82 \pm 0,13	2,38 \pm 0,74
14	1,50 \pm 0,25	3,59 \pm 0,38
21	1,56 \pm 0,48	4,07 \pm 0,43
62	-	4,25 \pm 0,59